

Daniële Million-Ferreira da Silva

Der Metabolismus von Bleitetraethyl und Bleitetra-
methyl durch das lebermikrosomale Monooxygenase-
system von Ratten.

Dem Fachbereich 1 (Physik) der Universität Bremen
vorgelegt als Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

im März 1985

"Tag des öffentlichen Kolloquiums": 7.5.1985

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. H. Diehl
Prof. Dr. D. Beyersmann

Prüfer der Dissertation: Prof. Dr. H. Grimme
Prof. Dr. A. Mayer-Heinricy

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungen	3
Zusammenfassung	4
Einleitung	9
1. Charakterisierung der Organobleiverbindungen $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$	11
1.1. Allgemeines	11
1.2. Physikalische Eigenschaften	11
1.3. Chemische Reaktionen	13
1.4. Biologische Wirkung	14
1.4.1. Toxische Wirkung auf Bakterien und Pilze	14
1.4.2. Wirkung auf Pflanzen	14
1.4.3. Toxische Wirkung auf Tiere	15
1.4.3.1. Vorkommen und Symptombild	15
1.4.3.2. Wirkungsmechanismus	17
1.5. Biologischer Abbau: Stand der Kenntnisse	19
1.5.1. Metabolismus in vivo	19
1.5.2. Metabolismus in vitro	20
1.5.3. Reaktionsmechanismus der Monooxygenierung der Organometallverbindungen am Beispiel von Zinn- und Bleiverbindungen	20
1.5.4. Organobleiverbindungen und Monooxygenasesystem (MOS)	22
2. Charakterisierung des Monooxygenasesystems	24
2.1. Entdeckung und Problematik	24
2.2. Reaktionen und Mechanismus	26

	Seite
3. Meßmethoden: Analytik der Organo- bleiverbindungen	33
3.1. Produktisolierung	33
3.1.1. Fällungsverfahren	34
3.1.1.1. Fällung mit $\text{Ba(OH)}_2 + \text{ZnSO}_4$	34
3.1.1.2. Fällung mit Uranylacetat ($\text{UO}_2(\text{CH}_2\text{CO}_2)_2$)	34
3.1.2. Ultrazentrifugationsverfahren	34
3.1.3. Ultrafiltration	34
3.1.4. Chromatographie über Extrelut®	36
3.2. Analytik des Bleiabbauproduktes	36
3.2.1. Colorimetrische Bestimmung mit Dithizon	36
3.2.1.1. Prinzip	36
3.2.1.2. Dithizon-Bleibestimmung nach Cremer (1957, 1959)	37
3.2.1.3. Dithizonbestimmung von Trialkylblei- verbindungen nach Henderson und Snyder (1961)	38
3.2.1.4. Diskussion der Dithizon-Bestimmung	38
3.2.2. Polarographische Bestimmung	39
3.2.2.1. Prinzip (Proszt et al., 1967, Heyrovsky und Kuta, 1965)	39
3.2.2.2. Polarographische Bestimmung von Pb(Et)_3^+	42
3.2.2.3. Diskussion	42
3.2.3. Atomabsorptionsspektroskopie (A.A.S.- Bestimmung)	43
3.2.3.1. Prinzip (B. Weltz 1975)	43
3.2.3.2. Anwendung bei der Bleibestimmung	44
3.2.3.3. Diskussion	45
4. Ergebnisse	47
4.1. Der mikrosomale Metabolismus von Blei- tetraethyl in Rattenleber	47

	Seite
4.1.1. Das enzymatische Material	47
4.1.2. Optimierung der Meßbedingungen	48
4.1.2.1. Puffer und pH	48
4.1.2.2. Produktbildung in Abhängigkeit von der Zeit	48
4.1.2.3. Enzymatische Aktivität als Funktion der mikrosomalen Konzentration	48
4.1.2.4. Cofaktorenanforderungen	51
4.1.2.5. Hemmstoffe	51
4.1.2.6. Messung der spezifischen Aktivität unter optimierten Bedingungen	52
4.1.3. Abbauprodukte des $\text{Pb}(\text{Et})_4$ -Metabolismus	52
4.1.3.1. Das Dealkylierungsprodukt	52
4.1.3.2. Die Seitenkette	53
4.1.4. Beteiligung des Cytochrom P-450 am $\text{Pb}(\text{Et})_4$ -Metabolismus	56
4.1.4.1. Apparatur und Meßbedingungen	56
4.1.4.2. Wirkung des CO/O_2 -Verhältnisses auf die spezifische Aktivität	56
4.1.4.3. Das photochemische Wirkungsspektrum	58
4.1.5. Kinetik des $\text{Pb}(\text{Et})_4$ -Abbaus bei den mikrosomalen M.O.S. von Kontroll-, Phenobarbital-induzierten und 3-Methylcholanthren-induzierten Ratten	58
4.1.5.1. Induktion	58
4.1.5.2. Spezifische Aktivitäten	59
4.1.5.3. Wechselwirkungen von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ mit Cyt.P-450	59
4.1.5.3.1 Bindungsspektren	59
4.1.5.3.2 Dissoziationskonstanten	62
4.1.5.4. Kinetik der Umsetzung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ zu $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$	65
4.1.5.4.1 Ansätze	65
4.1.5.4.2 Bestimmung der K_m 's und $V_{\max}$	65
4.1.5.4.3 Interpretation der Daten	69

4.1.5.5.	Bedeutung der Ks- und Km-Werte bei M.O.S.- katalysierten Reaktionen	69
4.2.	Der mikrosomale Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Met})_4$	72
4.2.1.	Meßbedingungen	72
4.2.1.1.	Zeitabhängigkeit	72
4.2.1.2.	Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der NADPH-Konzentration	75
4.2.1.3.	Cofaktoren	75
4.2.2.	Abbauprodukte des $\text{Pb}(\text{Met})_4$ -Metabolismus	76
4.2.2.1.	Das Dealkylierungsprodukt	76
4.2.2.2.	Die Seitenkette	76
4.2.3.	Wirkung der Induktion	77
4.2.4.	Bindung des $\text{Pb}(\text{Met})_4$ an Cyt. P-450	77
4.2.4.1.	Bindungsspektrum	77
4.2.4.2.	Dissoziationskonstante	80
4.2.5.	Kinetik der Umsetzung von $\text{Pb}(\text{Met})_4$	80
4.3.	Vergleich von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ als Substrate vom M.O.S. aus PB-Mikrosomen	80
4.3.1.	Theorie	83
4.3.2.	Wirkung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ auf die erste Reduktion von Cyt. P-450	84
4.3.2.1.	Apparatur und Meßtechnik	84
4.3.2.2.	Stimulierung der ersten Reduktion durch Substrat	85
4.3.3.	Substratinduzierter Sauerstoffverbrauch	87
4.3.3.1.	Methode	87
4.3.3.2.	Ergebnisse	87
4.3.3.3.	Diskussion	87
4.3.4.	Substratinduzierte NADPH-Oxidation	88
4.3.4.1.	Methode	88
4.3.4.2.	Ergebnisse	89
4.3.4.3.	Diskussion	89

	Seite
4.3.5. Hypothese über die unterschiedliche Um- setzung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$	90
4.4. Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ in vivo und in vitro	91
Literatur	94

Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ADH	Alkoholdehydrogenase
APDC	Ammoniumpyrrolidindithiocarbamat
ATP	Adenosin-5'-tri-phosphat
Cyt. b5	Cytochrom b 5
Cyt.P-450	Cytochrom P-450
GOD	Glucose-oxidase
K	Mikrosomen von Kontrolltieren
KW	Kohlenwasserstoff
3 MC	3-Methylcholanthren
MIBK	Methylisobutylketon
MOS	Monooxygenasesystem
NADH, NAD ⁺	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduzierte und oxidierte Form
NADPH, NADP ⁺	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduzierte und oxidierte Form
PB	Phenobarbital
Pb(Met) ₄	Bleitetramethyl
Pb(Met) ₃ ⁺	Bleitrimethylkation
Pb(Et) ₄	Bleitetraethyl
Pb(Et) ₃ ⁺	Bleitriethylkation
ZNS	Zentralnervensystem

Zusammenfassung

Die als Antiklopfmittel viel verwendeten Organobleiverbindungen Bleitetraethyl ($\text{Pb}(\text{Et})_4$) und Bleitetramethyl ($\text{Pb}(\text{Met})_4$) sind gesundheits- und umweltbelastende Stoffe, die eine doppelte Toxizität aufweisen, einmal als das Metall Blei und zweitens als dessen organische Verbindungen. Die biologische Wirkung des anorganischen Bleis ist wohlbekannt. Die schwere Neurotoxizität beider Tetraalkylverbindungen, die auf dem Trialkylbleiabbauprodukt beruht und durch eine Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung hervorgerufen wird, ist seit langem untersucht. Der metabolische Weg dagegen ist nur in groben Zügen aufgeklärt. Bekannt ist, daß beide Tetraalkylbleiverbindungen hauptsächlich in der Leber zum Trialkylbleiion abgebaut werden. Der Abbau erfolgt auf oxidativem Wege unter Abhängigkeit von molekularem Sauerstoff und NADPH und das verantwortliche Enzymsystem sitzt im endoplasmatischen Retikulum. Aus den Cofaktorenanforderungen und einigen Hemmungscharakteristika heraus wird vermutet, daß es sich um das Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasesystem handelt, welches für die Hydroxylierung bzw. O- und N-Dealkylierung der verschiedensten organischen Verbindungen verantwortlich ist.

Die vorliegende Arbeit hat den Anspruch, die Frage der Partizipation des Monooxygenasesystems am $\text{Pb}(\text{Et})_4$ - und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ -Metabolismus zu klären und die Reaktion am mikrosomalen Monooxygenasesystem von Rattenleber zu charakterisieren. Einen Literaturüberblick der biologischen Wirkung, des Toxizitätsmechanismus und des biologischen Abbaus in vivo und in vitro habe ich erstellt. Dabei habe ich zum Teil auf Literatur über organische Zinnverbindungen zurückgegriffen.

Bei der Erprobung der Analytik zeigte sich, daß die gängigen empfindlichen Meßmethoden, die sich zum quantitativen Nachweis eines Trialkylbleiions neben weiteren Bleispezies eignen, - Colorimetrie und Polarographie - der bevorstehenden Aufgabe nicht angepaßt waren. Denn hier wird mit Suspensionen aus Membranbruchstücken (Mikrosomen) gearbeitet, in denen das Enzymsystem

eingebettet ist, so daß sich in erster Linie die Frage der Beseitigung dieses biologischen Materials stellt, bevor das interessierende Reaktionsprodukt erfaßt werden kann. Dabei soll die Trennung schonend für das nicht umgesetzte, leicht zersetzende Tetraalkylblei sein und über einen breiten Konzentrationsbereich hinaus konstante Ausbeute bringen.

Diese Bedingungen werden durch die von mir zu diesem Zweck entwickelte ungewöhnliche Anwendung der Chromatographie über Extrelut® (Kieselgur) erfüllt. Da sich herausgestellt hat, daß mit dem biologischen Material auch das restliche Tetraalkylblei auf der Säule zurückbleibt, wird im Eluat allein das zu messende Bleiion erhalten, wobei immer noch eine komplexe Matrix vorhanden ist. Diese Matrix läßt sich nicht mit der colorimetrischen Dithizonbestimmung vereinbaren, weil sie interferierende und nicht maskierbare Eisenionen enthält. Andererseits läßt sich die Polarographie auch nicht anwenden, weil die noch vorhandenen gelösten biologischen Anteile die Basislinie der Polarogramme stark stören. Nun stellt die Atomabsorptionsspektroskopie eine schnelle und zuverlässige Alternative dar. Besonders nach Lösungsmitelextraktion erreicht die Bestimmung in der Flamme eine Empfindlichkeit von $2-3 \cdot 10^{-7}$ M Blei, die für unseren Zweck ausreichend ist. Diese Kombination der Chromatographie über Extrelut® mit der Atomabsorptionsspektroskopie-Bleibestimmung ist dann als Standardanalytik für das Bleitriethyl- und Bleitrimethylion angewandt worden. Ich lege eine detaillierte Darstellung des $\text{Pb}(\text{Et})_4$ -Metabolismus vor. Bei der Umsetzung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ zu $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ habe ich den mikrosomalen Ansatz auf Puffer, pH, Reaktionszeit, Enzymkonzentration und Cofaktor optimiert. Als einziges Reaktionsprodukt habe ich $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ identifiziert.

Die Hemmung der Reaktion durch Kohlenmonoxid und ihre Photoreversibilität mit einem Maximum bei 450 nm, der Absorptionswellenlänge des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes liefert den Kernbeweis der Monooxygenasesystem-Verantwortung für den $\text{Pb}(\text{Et})_4$ -Metabolismus.

Der Oberbegriff "Cytochrom P-450" schließt eigentlich eine Reihe von Isoenzymen mit begrenzter und überlappender Spezifität ein. Nach Behandlung mit Phenobarbital und 3-Methylcholanthren, die verschiedene Cyt. P-450-Subspezies induzieren, wird der $\text{Pb}(\text{Et})_4$ -Abbau stark stimuliert gegenüber der spezifischen Aktivität von Mikrosomen aus Kontrolltieren. Das bedeutet, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ von verschiedenen Isoenzymen umgesetzt wird. Eine kinetische Untersuchung wurde bei den drei Präparationszuständen durchgeführt.

Anhand von spektralen Änderungen kann die Bindung des Substrats an Cyt. P-450 verfolgt werden. In jedem Fall ergibt sich ein sogenanntes "Typ I"-Differenzspektrum (low spin- high spin Übergang). Die K_{ss} , $2 \cdot 10^{-6}$ M bei Kontroll- und Phenobarbital-, $7 \cdot 10^{-6}$ M bei 3-Methylcholanthren-Mikrosomen weisen eine hohe Affinität des $\text{Pb}(\text{Et})_4$ für das Monooxygenasesystem auf.

Die Kinetik der Umsetzung bestätigt die Teilnahme von verschiedenen Cyt. P-450-Subspezies am $\text{Pb}(\text{Et})_4$ -Metabolismus und sogar innerhalb jeden Induktionszustandes. Tatsächlich wird jeweils eine biphasische Kinetik festgestellt, aus der folgende K_m -Werte ermittelt werden: Kontrolle, $K_{m_1} = 2 \cdot 10^{-5}$ M, $K_{m_2} = 5,8 \cdot 10^{-4}$ M; Phenobarbitalmikrosomen, $K_{m_1} = 3,7 \cdot 10^{-5}$ M, $K_{m_2} = 2,4 \cdot 10^{-4}$ M; 3-Methylcholanthren-Mikrosomen, $K_{m_1} = 9,3 \cdot 10^{-6}$ M, $K_{m_2} = 3,1 \cdot 10^{-4}$ M.

In jedem Fall ist die Cyt. P-450-Subspezies mit der höheren K_m verantwortlich für den Hauptanteil des Metabolismus, wobei nicht entschieden werden kann, ob es die Folge eines schnellen turnover oder einer breiteren Enzymbeteiligung ist.

$\text{Pb}(\text{Et})_4$ gehört zu den Substraten mit relativ hohen spezifischen Aktivitäten im Vergleich zu anderen KW, während $\text{Pb}(\text{Met})_4$ noch schneller in das Trialkylbleiion umgesetzt wird. Sein Metabolismus wird auch nach Phenobarbital- und 3-Methylcholanthren-Induktion stark stimuliert. Dabei verläuft die Reaktion nicht linear mit der Zeit und hört rasch auf, was auf einer Inaktivierung des Monooxygenasesystems durch Produkt zu beruhen scheint. Die NADPH-steady state-Konzentration liegt um Faktor 10 höher als für die meisten Cyt. P-450-abhängigen Reaktionen. Hier zeige ich Daten über den Bleitetramethyl-Abbau bei Phenobarbital-Mikrosomen.

Die Bindung an Cyt. P-450 zeigt sich auch als ein "Typ I"-Differenzspektrum. Die Dissoziationskonstante K_s beträgt $6,65 \cdot 10^{-6} M$. Die Kinetik der $Pb(Met)_4$ -Umsetzung ist monophasisch ($K_m = 1,28 \cdot 10^{-5} M$). Es ist anzunehmen, daß das Substrat, das bindet, auch umgesetzt wird.

Die aufeinanderfolgende Zugabe von $Pb(Met)_4$ und $Pb(Et)_4$ zu Phenobarbital-Mikrosomen zeigt, daß beide Substrate an einem gemeinsamen Cyt. P-450-Anteil binden, während der Umfang der $Pb(Et)_4$ -Bindung sich auf weitere Isoenzyme erstreckt. Da $Pb(Et)_4$ auch mit einer 3-mal höheren Affinität als $Pb(Met)_4$ bindet, stellt sich die folgende Frage: ist die Umsatzdiskrepanz zugunsten $Pb(Met)_4$ hauptsächlich dadurch zu erklären, daß $Pb(Et)_4$ zwar an viel Cyt. P-450 bindet, aber nur durch wenige Enzymmoleküle umgesetzt wird, oder üben beide Substrate eine unterschiedliche Wirkung auf den Cyt. P-450-Redox-Zyklus aus? Die Bestimmung von leicht erfaßbaren Größen wie die erste Reduktion von Cyt. P-450, die NADPH-Oxidation, die Sauerstoffreduktion und deren Beeinflussung durch Substrat können Antworten geben.

Die substratinduzierte Stimulierung der ersten Reduktion von Cyt. P-450 (anaerob, CO) wirkt sich in einer Verdopplung der Geschwindigkeitskonstanten gegenüber Reduktion ohne Substrat aus. $Pb(Et)_4$ und $Pb(Met)_4$ als Substrate unterscheiden sich kaum auf dieser Stufe des Cyt. P-450-Zyklus.

Die Stimulierung des O_2 -Verbrauches durch $Pb(Met)_4$ dagegen ist das dreifache der von $Pb(Et)_4$. Dabei liegt das Verhältnis des spezifischen O_2 -Verbrauches zur spezifischen Aktivität bei 1,5 mit $Pb(Met)_4$ und 10-12 mit $Pb(Et)_4$. Die Messung der NADPH-Oxidation bestätigt dieses Ergebnis, so daß die Stoechiometrie $NADPH:O_2$: Produkt 1,4:1,5:1 mit $Pb(Met)_4$ als Substrat und 12:12:1 mit $Pb(Et)_4$ beträgt. Es wird klar, daß beide Substrate sich auf einer Stufe im Cyt. P-450-Zyklus, die zwischen Sauerstoffanlagerung und Substrathydroxylierung liegt, unterschiedlich verhalten. Während $Pb(Met)_4$ mit großer Effektivität umgesetzt wird, führt $Pb(Et)_4$ zum großen Teil zur Autooxidation und/oder Entkopplung.

Da die Stelle der Hydroxylierung bei Organometallverbindungen bekanntlich aus dem Zusammenspiel zwischen Reaktivität des betroffenen Kohlenstoffatoms und dessen Zugänglichkeit hervorgeht, wird dies unterschiedliche Verhalten von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ darauf zurückgeführt, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ aus sterischen Gründen eher in β -Stelle attackiert wird, während die α -Position, die bei $\text{Pb}(\text{Met})_4$ die einzige ist, eine höhere Reaktivität aufweist.

Schließlich zeigt diese in vitro Untersuchung, daß die in vivo-Befunde, bei denen weitgehend mehr Bleitetraethyl- als Bleitetramethyl-Metaboliten gefunden werden, nicht auf einem höheren Umsatz, sondern auf einer unterschiedlichen Aufnahme und Verteilung beider Tetraalkylbleiverbindungen beruhen muß.

Einleitung

Seit den vierziger Jahren bekamen Organobleiverbindungen, insbesondere Bleitetraethyl und Bleitetramethyl, eine außerordentliche Bedeutung als Antiklopfmittel. Sie sind zu 80% verantwortlich für die durch Blei verursachte Umweltverschmutzung, zum größten Teil als anorganisches Blei, wobei verflüchtigtes und unverbranntes organisches Blei 5 bis 10% des atmosphärischen Bleis darstellt. Dazu zählen auch die Tri- und Diorganoabbauprodukte.

Im Zusammenhang mit der verbreiteten Anwendung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ als Benzinadditive erfuhr man früh über ihre Toxizität und ihre physiologische Wirkung wurde intensiv untersucht. Dagegen wird deren biologischer Abbau wenig dokumentiert. In den Pionierarbeiten von Cremer* und von Stevens* wurde festgestellt, daß nach Inhalierung oder Injektion von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ seine Umsetzung zum Bleitriethylkation stattfindet und daß die toxische Wirkung gegenüber dem Zentralnervensystem auf letzterer Verbindung beruht. In vitro Versuche von Cremer* zeigten, daß die Umsetzung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ bzw. $\text{Pb}(\text{Met})_4$ zu $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ und $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ hauptsächlich in der lebermikrosomalen Fraktion stattfindet und O_2 und NADPH erfordert, Eigenschaften, die schon damals als Merkmale des Drogenmetabolismus bekannt wurden. Die wenigen Untersuchungen über den biologischen Abbau von Organobleiverbindungen, die bisher durchgeführt worden sind, stützen sich auf den Befund von Cremer* und gehen davon aus, daß er vom mikrosomalen Monooxygenasesystem abhängt, das die biologische Oxydierung von zahlreichen lipophilen Fremdstoffen katalysiert.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an Hand der Hemmung durch Kohlenmonoxyd und deren Lichtreversibilität bei 450 nm, die monooxygenaseabhängige Reaktionen bezeichnen, den endgültigen Beweis zu liefern, daß Organobleiverbindungen Substrate vom Cyt. P-450-Monooxygenasesystem sind.

* Cremer (1959)

* Stevens et al. (1960)

Weiterhin charakterisiere ich die enzymatische Dealkylierung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$. Dabei werden Rattenlebermikrosomen von Kontrolltieren und von Tieren, die mit den bekannten Induktoren des MOS, Phenobarbital und 3-Methylcholanthren, behandelt wurden, verwendet. Die kinetischen Parameter K_s , K_m , $V_{\max}$ werden bestimmt. Aus den kinetischen Daten geht hervor, daß trotz ähnlicher chemischer Struktur beide Substrate sich in ihrem Abbau relativ stark unterscheiden.

Zur Erläuterung werden ihre Wirkungen auf den Cytochrom-P-450-Reaktionszyklus verglichen, andererseits wird die Begründung des unterschiedlichen Metabolismus auf der Basis der verschiedenen chemischen Reaktivität von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ diskutiert.

Ein wesentlicher Teil meiner Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Nachweistechiken für Organobleiverbindungen. Die bisher angewandten Methoden bei der Isolierung, Identifikation und Quantifizierung der Bleiprodukte aus dem biologischen Abbau von Organobleiverbindungen haben sich als ungeeignet erwiesen, um einerseits den Metabolismus dem MOS zuzuordnen und andererseits die Reaktion kinetisch zu charakterisieren. Die Produktisolierung und die Meßmethode sollen ermöglichen, das Produkt bis 10^{-7} molar und über einen breiten Konzentrationsbereich quantitativ zu gewinnen und zu messen. Aus den mit biologischem Material zusammenhängenden Schwierigkeiten in der quantitativen Bestimmung des ionischen Bleiprodukts neben einem Bleisubstrat habe ich eine für mein Ziel geeignete Meßmethode entwickelt und optimiert.

1. Charakterisierung der Organobleiverbindungen $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$

1.1 Allgemeines

Organometallverbindungen, das heißt Verbindungen, bei denen das Metallatom durch Kohlenstoff an einem organischen Radikal gebunden wird, unterscheiden sich grundsätzlich in ihren Eigenschaften und in ihrer biologischen Wirkung vom ursprünglichen Metall und dessen anorganischen Verbindungen.

Blei gehört zu den Elementen aus der IVb Gruppe (C, Si, Ge, Sn, Pb), von denen es das schwerste ist. Die äußere Schale enthält 4 Elektronen in der Konfiguration $2s^2 2p^2$. Theoretisch sollte es genauso gut Elektronen abgeben wie aufnehmen können (für C trifft das auch zu). Tatsächlich jedoch tritt mit zunehmender Atomgröße der metallische Charakter hervor und im allgemeinen verbinden sich die IVb Elemente mit elektronegativeren Elementen. Außerdem besteht die Tendenz von einem tetravalenten (Hybridisierung sp^3) zu einem divalenten Zustand von C nach Pb überzugehen. In seinen organischen Verbindungen jedoch bildet Blei eher tetravalente Produkte: Diorganobleiverbindungen sind extrem labil.

Die C-Pb Bindung ist kovalent, obwohl durch den metallischen Charakter von Pb polarisiert. Doch sie ist nicht hydrolysierbar und unter der Wirkung von Halogenen, Oxidanten oder Anhydriden erfolgt eine Spaltung unter Radikalbildung.

1.2 Physikalische Eigenschaften

$\text{Pb}(\text{Met})_4$ und $\text{Pb}(\text{Et})_4$ als symmetrische Moleküle gehören zu den stabilsten unter den Organobleiverbindungen. Es sind farblose Flüssigkeiten, die sich in den meisten organischen Lösungsmitteln inklusiv Ethanol lösen und die weitgehend unlöslich in Wasser

sind. Trotz des nur um 100°C liegenden Siedepunktes, bei dem $\text{Pb}(\text{Et})_4$ sich zersetzt, haben sie einen bemerkenswert hohen Dampfdruck, der für $\text{Pb}(\text{Et})_4$ (Dampfdruck 0,15 Torr) bei 20°C und völliger Sättigung eine Luft mit 2,7 mg Pb/Liter und für $\text{Pb}(\text{Met})_4$ (Dampfdruck 22,5 Torr) mit über 340 mg Pb/Liter ergibt. Zum Vergleich, die Sättigungsmenge für Wasserdampf unter gleichen Bedingungen liegt bei 20 mg/l. Das ist von Bedeutung bezüglich der Kontaminierungsmöglichkeit sowohl durch die Haut als auch durch die Atemwege.

Beide Substanzen sind wenig reaktiv, stabil gegenüber Wasser und Luft, aber längerer Aufenthalt unter Licht und Luft verursacht eine langsame Zersetzung zu nicht gut identifizierten Produkten. $\text{Pb}(\text{Et})_4$ ist weniger stabil als $\text{Pb}(\text{Met})_4$.

Einige physikalische Daten, die für diese Arbeit von Interesse sind, werden in Tabelle 1 angegeben.

Physikalische Eigenschaften	$\text{Pb}(\text{Met})_4$	$\text{Pb}(\text{Et})_4$
Molekulargewicht (g/Mol)	267,33	323,44
Dichte (g cm^{-3})	1,995	1,66
Schmelzpunkt ($^{\circ}\text{C}$)	- 30	-130 - -137
Siedepunkt ($^{\circ}\text{C}$)	110	87-90/11mm (Zersetzung)
Wasserlöslichkeit (25°C) M.	$6,7 \cdot 10^{-5}$	$6,2 \cdot 10^{-7}$
Dampfdruck (20°C) Torr	22,5	0,15

Tabelle 1 : Einige physikalische Eigenschaften von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$.

1.3 Chemische Reaktionen

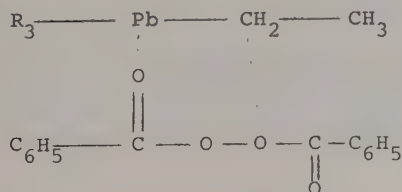
Die Reaktionen von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ beinhalten ausschließ-
lich die Spaltung der Pb-C Bindung. Sie können mit nukleophilen
aber leichter mit elektrophilen Substanzen reagieren.

Hier werden die wichtigsten Reaktionen kurz erwähnt. Ich stütze
mich dabei auf das Buch von Shapiro, 1974, "The organic compounds
of lead".

Pyrolyse und Photolyse (U.V., Luft) führen bei $\text{Pb}(\text{Met})_4$ zu Blei,
Ethan, Methan und bei $\text{Pb}(\text{Et})_4$ zu Ethan, Ethylen, Butan, zum Teil
als Rekombinationsprodukte der entstandenen Radikale. Außerdem
sind die Reaktionen von Bedeutung, bei denen eine elektrophile
Spezies das C-Atom angreift und eine $\text{R}_3\text{Pb X}$ Verbindung (R: Alkyl.)
bildet. Unter strengeren Bedingungen kommt es auch zu $\text{R}_2\text{Pb X}_2$.
X können Halogene, Halogensäure, Halogensalze, anorganische und
organische Säuren, Anhydride, Metalle und Metallsalze sein.
 $\text{R}_3\text{Pb X}$ und $\text{R}_2\text{Pb X}_2$ sind kovalente Verbindungen, die jedoch in
Abhängigkeit von der Polarität der Gruppe X in wässriger Lösung
als vollständig dissoziiert vorkommen können, so daß sie oft Tri-
und Diorganobleisalze genannt werden.

Eine Reaktion möchte ich detaillierter darstellen und zwar die
von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ mit Peroxiden, da sie bei der Diskussion mit der vom
MOS katalysierten Reaktion verglichen werden kann.

$\text{Pb}(\text{Et})_4$ und Dibenzoylperoxid bei 80°C führen zu Triethylblei-
benzoat und einer Mischung aus Ethan, Ethylen und Butan.
Es wird die Bildung eines zyklischen Zwischenproduktes



oder ein Radikalmechanismus postuliert.

1.4 Biologische Wirkung

$\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ und andere Organobleiverbindungen sind für alle Lebewesen hoch toxisch. Dabei beruht die Toxizität auf der auf abiotischem oder metabolischem Wege entstehenden Triorganobleiverbindung (siehe unten). Über die Mannigfaltigkeit der hervorgerufenen funktionellen Störungen hinaus kann die Wirkung immer auf eine Destabilisierung der biologischen Membranen zurückgeführt werden.

1.4.1 Toxische Wirkung auf Bakterien und Pilze

Bei diesen Organismen sind Trimethyl- und Triethylbleiverbindungen weit weniger toxisch als die propyl-, butyl-, pentyl- und phenylsubstituierten Verbindungen. Das Wachstum von Bakterienkolonien wird gehemmt, Pilze werden vernichtet, so daß Tributyl- und Tripentyl-Pb als Fungizide in Lackfarben und Holzschutzmitteln mit Erfolg verwendet werden (Röderer, 1984).

1.4.2 Wirkung auf Pflanzen

Die Wirkung der Organobleiverbindungen auf Pflanzen zeigt sich als Hemmung des Wachstums, Reduktion der Photosynthese und Veränderungen der Zellorganellen. Entstellungen der Chloroplasten, der Nuklei, strukturelle Änderungen des Golgi und des endoplasmatischen Retikulums, Schwellung der Mitochondrien deuten auf eine starke Beeinträchtigung der Struktur und Funktionen von Plasma- und Endomembranen hin. Die Mitose wird vor allem in der Telophase (Zytokinetische Vorgänge) gestört, so daß bei Algen z.B. die Bildung von polynukleierten Riesenzellen beobachtet wird.

Obwohl die $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ - und $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ -Wirkungen wegen ihrer weiten Verbreitung am meisten untersucht worden sind, scheinen auch für höhere Pflanzen die Tributyl- und Tripentylverbindungen am toxischsten zu sein (Röderer, 1984).

1.4.3 Toxische Wirkung auf Tiere

Wie bei anderen Lebewesen beruht die Organobleitoxizität für Tiere auf den trisubstituierten Verbindungen. Sie ist am besten bei Säugetieren dokumentiert, wobei allerdings die Verbindungen mit kurzer Alkylkette (Methyl-, Ethyl-) die stärkste Wirkung aufweisen. Andere Tierarten, Würmer, Schalentiere, Fische und Insekten, sind bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Organozinnverbindungen untersucht worden (Luitjen, 1979). Das erklärt sich durch einige industrielle Anwendungen von diesen Substanzen; Tributylzinn wird in Holzschutzmitteln und in Schutzanstrichen für Schiffe, Tricyclohexylzinn als Insektizid gebraucht. Es ist andererseits bekannt, daß Triorganozinn und Triorganobleiverbindungen einen sehr ähnlichen Wirkungsmechanismus besitzen (Aldridge, 1976; Selwyn, 1976; Cremer, 1956, 1968; Skilleter, 1976).

Die meisten Kenntnisse darüber wurden an den Organozinnverbindungen erworben. Hier werden wir uns mit den Organobleiverbindungen und ihre Toxizität auf Säugetiere befassen, d.h. auf Menschen und Labortiere.

1.4.3.1 Vorkommen und Symptombild

Die besondere durch $\text{Pb}(\text{Et})_4$ hervorgerufene Gefahr liegt neben Inhalierung in seiner starken Hautresorption. Akute Vergiftungen beim Menschen wurden zu Beginn seiner Einführung als Antiklopfmittel häufig beobachtet. Tödliche Unfälle kamen bei der Herstellung, Verarbeitung und Reinigung von Benzintanks vor. Solche Vergiftungen sind mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$ noch nicht beobachtet worden, was damit zusammenhängt, daß diese Verbindung viel später in Gebrauch kam, so daß inzwischen Erfahrung im Umgang mit Organobleiverbindungen gewonnen worden war.

"Das Vergiftungsbild ist geprägt durch Erscheinungen von Seiten des Zentralnervensystems. Hör- und Gesichtshalluzinationen, Krampfanfälle, motorische Störungen und Sprachstörungen sowie

Delirium und Koma sind die Symptome einer schweren akuten Vergiftung. Bei leichteren Vergiftungen kommt es zu allgemeiner Ruhe- und Schlaflosigkeit, erlebnisreichen Wach- und Schlafträumen, Angst, Schwindelgefühl, Erbrechen und Appetitverlust". (Zitiert aus "Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von M.A.K.-Werten", D. Henschler, Verlag Chemie). Es kann der Tod eintreten oder es bilden sich die Symptome zu einem scheinbar normalen Zustand hin langsam zurück. Entgegen früherer Annahmen jedoch scheint es, daß nach akuter Vergiftung oder langzeitiger Exposition irreversible Gehirnschäden stattfinden (Grandjean, 1984). Das stellt das Problem der chronischen Einwirkung dar, der arbeitende Menschen (Tankstellen, Mechanische Werkstätten, usw.) sowie die allgemeine Bevölkerung in einer kontaminierten Umwelt ausgesetzt sind. Die wissenschaftlichen Ergebnisse über chronische Tetraalkylbleivergiftung sind widersprüchlich. Kehoe (1964) berichtet, daß es in 40 Jahren zu keiner chronischen Tetraethylbleivergiftung gekommen ist (es muß zwischen anorganischem und organischem Blei immer unterschieden werden). Demgegenüber stehen die Arbeiten von Gutniak et al. (1964) und Oettel (1964). Der in der BRD 1966 festgelegte MAK-Wert von $0,075 \text{ mg/m}^3$ bzw. $0,01 \text{ ppm}$ (bez. auf Pb) weist auf die ernstzunehmende Gefährlichkeit von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ hin. Bedenklich allerdings ist die weiterbestehende Kontroverse über bleihaltiges oder bleifreies Benzin.

Im Tierexperiment ist die Toxizität von $\text{Pb}(\text{Met})_4$ und $\text{Pb}(\text{Et})_4$ durch ihre Trialkylabbauprodukte auf Ratte, Maus, Kaninchen, Hund und Affen untersucht worden. Je nach Spezies ist die eine oder die andere Verbindung am toxischsten. Wie für den Menschen scheint für die Ratte $\text{Pb}(\text{Et})_4$ toxischer als $\text{Pb}(\text{Met})_4$ zu sein (Cremer, 1959, 1961; Schepers, 1964), obwohl das $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ nur doppelt so giftig ist wie $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$. Die LD_{50} liegt bei 108 mg/kg für $\text{Pb}(\text{Met})_4$, bei $15,4 \text{ mg/kg}$ für $\text{Pb}(\text{Et})_4$, bei $25,5 \text{ mg/kg}$ für $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ und bei $11,2 \text{ mg/kg}$ für $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$. Dies wird von Cremer darauf zurückgeführt, daß $\text{Pb}(\text{Met})_4$ langsamer metabolisiert wird als $\text{Pb}(\text{Et})_4$.

Bevor ich anhand meiner in vitro Ergebnisse diese Annahme diskutiere, möchte ich darauf hinweisen, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ viel lipophiler als $\text{Pb}(\text{Met})_4$, und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ viel flüchtiger als $\text{Pb}(\text{Et})_4$ ist, so daß sich die tatsächliche Aufnahme und Verteilung im Gewebe von beiden Substanzen entsprechend unterscheiden müssen.

Bei Ratten werden bei akuter Vergiftung mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$ Lethargie, Schläffheit, Somnolenz und Koma beobachtet, während mit $\text{Pb}(\text{Et})_4$ Erregbarkeit, Hypermotilität und Krämpfe auftreten. Dabei zeigt sich, daß $\text{Pb}(\text{Met})_4$ eine destruktivere Wirkung auf die Neuronen ausübt als $\text{Pb}(\text{Et})_4$ (Schepers, 1964). Ferner wurden in dieser umfangreichen komparativen Studie Langzeitversuche mit $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ durchgeführt, die beweisen, daß histologische Veränderungen in verschiedenen Teilen des ZNS, die auf Läsionen oder Destruktion der Nervenzellen beruhen, stattfinden, auch wenn keinerlei Symptome vorliegen. Außerdem werden Lebergewebe, aber auch Lungen, Herz, Magen, Pankreas und Endokrinsystem betroffen. Dabei hat $\text{Pb}(\text{Met})_4$ einen verheerenderen Effekt auf die Zellen als $\text{Pb}(\text{Et})_4$.

1.4.3.2 Wirkungsmechanismus

Die ersten in vitro Experimente über die zellphysiologische Wirkung der Triorganobleiverbindungen $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ und $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ wurden an Gehirnschnitten durchgeführt* (Cremer, 1959; Cremer und Callaway, 1961). In Aerobiose wird eine Verminderung der Sauerstoffaufnahme bei gleichzeitiger Erhöhung des Glucose-Verbrauchs und des Laktat/Pyruvat-Verhältnisses festgestellt, d.h. eine Verminderung der Atmung zugunsten der Glycolyse. In Anaerobiose zeigt sich eine partielle Hemmung der Glycolyse (Verringerung der Glucose-Aufnahme und der Laktat-Bildung). Die Autoren finden keine enzymatische Blockierung, wie sie z.B. durch Zyanid hervorgerufen wird. Schlußfolgerung ist, daß die Hemmung in der Beeinträchtigung der ATP- und NAD-Konzentrationen ihre Ursache hat.

* Solche Experimente waren schon von Aldridge und Cremer (1957) An Triäthylzinnverbindungen gemacht worden.

Allein Gehirnzellen reagieren funktionell sehr stark auf diese Blockierung der oxidativen Phosphorylierung durch Trialkylblei-verbindungen, aber isolierte Mitochondrien aus verschiedenen Geweben weisen keinerlei Unterschiede in ihrer Reaktion auf. Das Trialkylbleiion bindet an die mitochondriale Membran und stört dabei den zwischen Matrix und äußerem Medium vorhandenen OH^-/Cl^- -Gradienten (Skilleter, 1975; Aldridge et al., 1977). Es gibt unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit von der Organobleikonzentration, die auf zwei Bindungsarten, einer mit niedriger Affinität und hoher Empfindlichkeit und einer mit hoher Affinität und niedriger Empfindlichkeit beruhen.

- Das Trialkylblei fungiert als Ionophor für Cl^- -Ionen (1. Bindung).

Das drückt sich durch eine Erhöhung der ATPase-Aktivität und der oxidativen Phosphorylierung zur Aufrechterhaltung des OH^-/Cl^- -Gradienten aus und macht sich bei kleinen Organobleikonzentrationen bemerkbar.

- Das Trialkylblei bindet an bestimmten Komponenten der koppelnden ATPase (Faktor F_1), die das "energy conservation" System darstellen (2. Bindung). Dadurch erfolgt eine Hemmung des Protonenflusses (oder des Elektrontransportes) der Atmungskette. Dieser Effekt tritt unter höherer Organobleikonzentration als erster auf. Das entspricht den obengenannten Ergebnissen von Cremer. Sehr hohe Bleikonzentrationen bewirken wegen physikalischen Membranbruchs eine Schwellung der Mitochondrien.

Die Triorganoabbauprodukte von $\text{Pb}(\text{Met})_4$ und $\text{Pb}(\text{Et})_4$ haben denselben Effekt auf die Membran der Nervenzellen, so daß auch dort der OH^-/Cl^- -Gradient zwischen innerem und äußerem Medium zerstört wird; dies verursacht einen permanenten Excitationszustand der Nervenzellen, was möglicherweise ihre Zerstörung bewirkt, besonders in denjenigen Bereichen des ZNS, deren Zellen normalerweise wenig Aktivität aufweisen (Cremer, 1984).

1.5 Biologischer Abbau: Stand der Kenntnisse

Wie schon erwähnt beruht die toxische Wirkung von Tetraalkylverbindungen auf deren Trialkylabbauprodukten. Die Untersuchungen über Metabolismus konzentrieren sich auf $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und es gibt wenig Material über den Abbau von $\text{Pb}(\text{Met})_4$. Es liegt außerdem wenig Literatur über den Reaktionsmechanismus vor. In dieser Hinsicht sind Organobleiverbindungen am Rande der Organozinnverbindungen betrachtet worden.

1.5.1 Metabolismus in vivo

Nach Inhalierung, peroraler oder intraperitonealer Applikation von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ wird $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ hauptsächlich im Blut (Erythrozyten) und in der Leber nachgewiesen (Stevens et al. 1956, 1960; Cremer, 1959). $\text{Pb}(\text{Met})_4$ wird zu $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ umgesetzt (Cremer and Callaway, 1961). Die Trialkylkationen sind stabil und verbleiben im Körper oft für mehrere Wochen. Die Ausscheidung erfolgt langsam in Urin und Fäkalien. Der Unterschied in Toxizität zwischen $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ ist von Cremer auf deren unterschiedliche Abbauraten zum Trialkylkation zurückgeführt worden. Danach soll $\text{Pb}(\text{Et})_4$ schneller als $\text{Pb}(\text{Met})_4$ in vivo bei Ratten umgesetzt werden. Andererseits ist berichtet worden, daß die Lungenabsorption von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ höher als die von $\text{Pb}(\text{Met})_4$ ist (Heard et al., 1979). $\text{Pb}(\text{Met})_4$ hat einen höheren Dampfdruck und eine niedrigere Lipophilizität. Außerdem muß die Verteilung der Triorganobleiprodukte im Organismus berücksichtigt werden: $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ bindet stärker an die Erythrozyten als $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ (Schepers, 1964), so daß eine direkte Beziehung zwischen Abbau und Toxizität in vivo schwer herstellbar ist.

Es ist auch umstritten, ob in vivo die Trialkylbleiverbindungen weiter metabolisiert werden. Stevens und Cremer finden kein Di-alkylblei. Bridges (1967) berichtet über in vivo und in vitro Abbau von Teträthylzinn zu Tri-, Di- und Monoalkylprodukt. Bolanowska (1968) weist auch kein Diethylblei in vivo bei Ratten nach, sondern $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ und Pb^{++} und kommt zur Schlußfolgerung, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ durch zwei unabhängige metabolische Wege abgebaut wird.

1.5.2 Metabolismus in vitro

Es gibt keine Literaturhinweise über den Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Met})_4$ in vitro. Als erste demonstrierte Cremer (1959) die Umsetzung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ zu $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ in der mikrosomalen Fraktion der Leberzellen unter Abhängigkeit von NADPH und O_2 . Die Reaktion wurde von SKF 525 A (Diethylaminoethyldiphenylpropylacetat) gehemmt. Damals wurden diese Eigenschaften als Merkmale des Drogenmetabolismus erkannt und in Zusammenhang gebracht.

Bolanowska et al. (1971) untersuchten die Dealkylierung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ in Ratten- und Kaninchen-Gewebehomogenaten. Casida et al. (1971) fanden $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ als Produkt von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Bu})_2^{++}$ als Abbauprodukt von $\text{Pb}(\text{Bu})_3^+$ mit der lebermikrosomalen Fraktion und NADPH als Enzymsystem. In weiteren Veröffentlichungen beschäftigen Sie sich hauptsächlich mit dem Metabolismus von Organozinnverbindungen und schreiben ihm das Cytochrom-P-450 Monooxygenasesystem als enzymatische Basis zu (Fish et al., 1975, 1976a,b, 1977; Kimmel et al. 1977a,b, 1980).

Später erschien eine interessante Studie über den oxidativen Abbau von Ethylmetallverbindungen aus der Gruppe IV, Germanium, Zinn und Blei (Prough et al., 1981). Durch Bestimmung von volatilen Alkylabbauprodukten Ethan und Ethylen stellen die Autoren fest, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ sowie $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ dealkyliert werden. Dabei arbeiten sie mit Lebermikrosomen von Phenobarbital behandelten Ratten. Die Wirkung von Hemmern (SKF 525 A, Metyrapon, Octylamin), von spezifischen Antikörpern und von Kohlenmonoxid auf den Abbau von $\text{Sn}(\text{Et})_3^+$ weist auf die Implikation des Monooxygenasesystems hin.

1.5.3 Reaktionsmechanismus der Monooxygenierung der Organometallverbindungen am Beispiel von Zinn- und Bleiverbindungen

Beim Versuch zu verstehen, wie die Dealkylierung von $\text{Pb}(\text{Met})_4$ und $\text{Pb}(\text{Et})_4$ möglicherweise verläuft, müssen wir hauptsächlich auf Organozinnverbindungen zurückgreifen. Während in vivo und in vitro Tetraethylzinn sequentiell über Tri- und Di- zu Monoethylzinn

dealkyliert wird (Bridges et al., 1967; Casida et al., 1971), ergeben Tetrabutyl-, Tributyl-, Tricyclohexyl- und Cyclohexyl-triphenylzinnverbindungen auch hydroxylierte Produkte (Fish et al., 1975, 1976a,b, 1977; Kimmel et al. 1977, 1980). $\text{Sn}(\text{Bu})_3^+$ z.B. wird nicht nur zu $\text{Sn}(\text{Bu})_2^{++}$ sondern auch zu $\text{Sn}(\text{Bu})_3^+$ -Hydroxymetaboliten umgesetzt. Dabei wird die OH-Gruppe auf dem β -, γ - oder δ -Kohlenstoff der Alkylkette lokalisiert (Fish et al., 1975, 1976a, b). Als Abspaltungsprodukte werden 1-Butanol und 1-Buten identifiziert. Das erste tritt spontan auf und wird auf die Spaltung einer α -hydroxylierten Butylkette zurückgeführt. Das zweite wird unter saueren Bedingungen gebildet und resultiert aus einer β -Eliminationsreaktion an dem β -C hydroxylierten Metaboliten. Zusammengefaßt wird aus dem mikrosomalen Metabolismus von $\text{Sn}(\text{Bu})_3^+$ folgendes Produktmuster gebildet: 24% α -C-OH, 50% β -C-OH, 18% γ -C-OH und 8% δ -C-OH.

Ähnlich entstehen aus Tricyclohexylzinn trans-2-C-OH als Hauptprodukt, cis-3-, trans-3- und trans-4-. Trans-2-C-OH-Metabolit spaltet Cyclohexen unter saueren Bedingungen ab. Der in vitro Metabolismus von Cyclohexyltriphenylzinn zeigt, daß die Phenylgruppen nicht hydroxyliert werden. Bei diesem Substrat ist die Trans-4-Hydroxyverbindung das Hauptprodukt (Fish et al., 1977; Kimmel et al., 1977, 1980). Mit den obengenannten Modells substraten läßt sich beweisen, daß die Primärreaktion mit Mikrosomen und NADPH eine Hydroxylierung an einem Kohlenstoff ist, was für weitere Organometallverbindungen auch gelten mag. Das Hydroxylierungsmuster der Butylzinnverbindungen, das sich von denjenigen einfacher Alkylketten wie Butan und Pentan unterscheidet, weist auf einen Steuerungseffekt des Zinnatoms bezüglich der Hydroxylierungsstelle hin (Fish et al. 1976a, b). Aus dem Vergleich zwischen mikrosomalem Enzymsystem und chemischen Modellsystemen wie Persäuren und $\text{Fe}^{++}/\text{H}_2\text{O}_2$ finden die Autoren, daß das Produktmuster eher mit einem Freiradikal- als mit einem Oxenoidmechanismus (siehe unten) übereinstimmt. Aus Tetraethyl und Triethylverbindungen von Ge, Sn und Pb ergeben sich unter Wirkung von Mikrosomen und NADPH Ethylen und Ethan als Abspaltungspro-

dukte. Kein Ethanol wird nachgewiesen (Prough et al., 1981). In Luft variiert das Verhältnis beider Gase je nach metabolisierter Verbindung, aber es steht stark zugunsten des Ethylens. In Anaerobiose wird die Gasproduktion reduziert, und es wird jetzt verhältnismäßig mehr Ethan gebildet. Aus diesen Ergebnissen heraus schlagen die Autoren zwei mikrosomale Abbauewege vor, einen oxidativen Weg, der nach Bildung eines instabilen hydroxylierten Zwischenproduktes zu Ethylen und Ethan führt, und einen reduktiven Weg, wobei ein Alkylradikal abgespalten und zu Ethan und Ethylen rekombiniert wird. Dabei wird nicht erläutert, wie das hydroxylierte Zwischenprodukt zu Ethan und Ethylen führt, und ob die OH-Gruppe auf dem α - oder β -Kohlenstoff vorkommt. Die Autoren vermuten einen zugrundeliegenden Radikalmechanismus, ohne es jedoch zu begründen.

1.5.4 Organobleiverbindungen und Monooxygenasesystem

Zwischen der Pionierarbeit von Cremer und der zuletzt zitierten Studie von Prough et al. haben sich die Hinweise angehäuft, daß das Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasesystem für den ersten Schritt im Metabolismus von verschiedenen Organometallverbindungen aus der Gruppe IV verantwortlich ist. Hier will ich sie kurz zusammenfassen:

- Lokalisierung des Abbaus, hauptsächlich in der mikrosomalen Fraktion der Hepatozyten, unter Abhängigkeit von Sauerstoff und NADPH.
- Hemmung durch bekannte Hemmstoffe des Monooxygenasesystems und im Falle von $\text{Sn}(\text{Et})_3^+$ durch Kohlenmonoxid.
- Ansprechbarkeit auf Induktion von Cytochrom P-450 durch Phenobarbital: $\text{Sn}(\text{Et})_3^+$ (Prough et al. 1981).
- Nachweis von hydroxylierten Metaboliten, die eine bevorzugte Regio- und Stereoselektivität, jedoch keine absolute Spezifität aufweisen.

- Inaktivierung von Cytochrom P-450 durch Produkt im Falle von $\text{Sn}(\text{Et})_4$.

Trotz der eben zitierten Hinweise liegt bisher kein direkter Nachweis der Beteiligung von Cytochrom P-450 am Metabolismus der Organometallverbindungen.

Besonders die Hemmung durch CO, die als so charakteristisch für MOS -katalysierte Reaktionen angesehen wird, ist nicht ausreichend, wenn sie nicht mit der Prüfung ihrer Lichtreversibilität gekoppelt ist. Dabei kann eine Reaktion dem MOS erst zugeschrieben werden, wenn das photochemische Wirkungsspektrum und das Absorptionsspektrum des Cyt. P-450-CO-Komplexes sich decken (Cooper et al. 1979).

2. Charakterisierung des Monooxygenase-Systems

2.1 Entdeckung und Problematik

Cytochrom P-450 wurde zum erstenmal in Mikrosomen der Rindernebennierenrinde und der Rattenleberzellen von Klingenberg (1958) und Garfinkel (1958) als ein Pigment beschrieben, das im reduzierten Zustand eine Bindung mit Kohlenmonoxid einging, welche ein Absorptionsmaximum bei 450 nm (γ -Bande), einer ungewöhnlichen Lage für einen Hämprotein-CO-Komplex, aufwies. Es war andererseits bekannt, daß auch in der mikrosomalen Fraktion der Nebennierenrinde eine durch CO hemmbare C_{21} -Steroid-Hydroxylierung stattfand. Unter Eingebung von Otto Rosenthal, die Warburgsche Methode zur Messung der Photoreversibilität der Fe^{++} -CO Komplexe einzusetzen, wurden beide Beobachtungen von Estabrook et al. (1963) in Zusammenhang gebracht. Es wurden Adrenalcortexmikrosomen mit NADPH und 17-Hydroxyprogesteron in Gegenwart von CO inkubiert und bei verschiedenen Wellenlängen mit Licht bestrahlt. Dabei wurde eine lichtinduzierte Reversion der Hemmung der Steroid- C_{21} -Monooxygenase festgestellt. Bei den Wellenlängen, wo der CO-Hämproteinkomplex maximal absorbierte, wurde auch die Aufhebung der Hemmung am höchsten. Es stellte sich heraus, daß die Umkehrung der CO-Hemmung der Steroid- C_{21} -Hydroxylierung ein Maximum bei 450 nm zeigte, was bewies, daß Cytochrom P-450 die Terminaloxidase für diese Reaktion war. Es ist auch die Standardprozedur zur Identifizierung einer Substanz als Substrat von P-450 geblieben.

Unter Zugabe von Steroiden wurde außerdem eine Änderung im Spektrum des oxydierten Cyt. P-450 festgestellt, die als Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes interpretiert wurde, Cooper et al. (1968). Diese spektrale Änderung äußerte sich in Differenzmessungen als ein Peak bei 390 nm und ein Minimum bei 420 nm ("Typ I" Bindungsspektrum). Dasselbe Bild wurde durch verschiedene Pharmaka hervorgerufen und in einigen Fällen bildete sich ein umgekehrtes Spektrum mit einem Minimum bei 390 nm und einem

Maximum bei 430 nm ("Typ II" Bindungsspektrum). Später wurden diese substratinduzierten Differenzspektren als high spin-low spin Spektrenübergänge (und umgekehrt) von einem Fe^{+++} -Häm-protein verstanden. Bald konnte dem Cytochrom P-450 die Hydroxylierung verschiedener lipophiler organischer Verbindungen und nicht zuletzt von Pharmaka und anderen Fremdstoffen zugeordnet werden. Dabei stand das breite Produktmuster bei Xenobiotika der Spezifität der Hydroxylierungsstellen bei den sogenannten endogenen Substraten, Steroiden und Fettsäuren, gegenüber, was die Frage, ob Cytochrom P-450 ein einziges Molekül oder eine Gruppe von Isoenzymen darstellte, erhob. Als membrangebundenes Enzym war Cyt. P-450 schwer isolierbar. Versuche, es aus dem endoplasmatischen Retikulum zu lösen, führten zu dessen Inaktivierung und Verlagerung des CO-Komplex-Absorptionsmaximums von 450 nach 420 nm. Schließlich gelang es Omura et al. (1966) aus vorsichtigen Detergenzaufschlüssen, drei Komponenten zu isolieren und als aktives System zu rekonstituieren: Ein Flavoprotein, NADPH-Cytochrom-P-450 Reduktase, Cytochrom P-450 als Terminaloxidase und Phosphatidylcholin (siehe auch Lu und Coon, 1968). (Es soll bemerkt werden, daß in der intakten Membran das P-450-System mit dem Cytochrom-b5-System topologisch und funktionell assoziiert vorliegt, das in der Denaturierung der Fettsäuren eine Rolle spielt. Es besteht aus Cytochrom b5, einem Elektronenüberträger, und der NADH-Cyt. b5-Reduktase.)

Außerdem konnten verschiedene Isoenzyme von Cyt. P-450 getrennt werden, die sich in Molekulargewicht, Sequenz, optischen Eigenschaften und Substrat-Spezifität unterschieden (Coon et al. 1982). Unter den 20 bis 30 Spezies, die vermutet werden, sind zwei Spezies oder Isoenzymgruppen besonders gut untersucht worden: Die eine Gruppe wird vermehrt synthetisiert, wenn Tiere mit Phenobarbital induziert werden, die andere nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren, einem krebserregenden polyzyklischen Kohlenwasserstoffmolekül. Jedoch steht die Zahl der Cyt. P-450-Untersorten in keiner Beziehung zu deren weiten Substratpalette und jedes Enzym besitzt eine überlappende Spezifität, die einmalig bei Enzymsystemen ist. Z.Zt. sind ca. 10 Isoenzyme identifiziert.

2.2 Reaktionen und Mechanismus

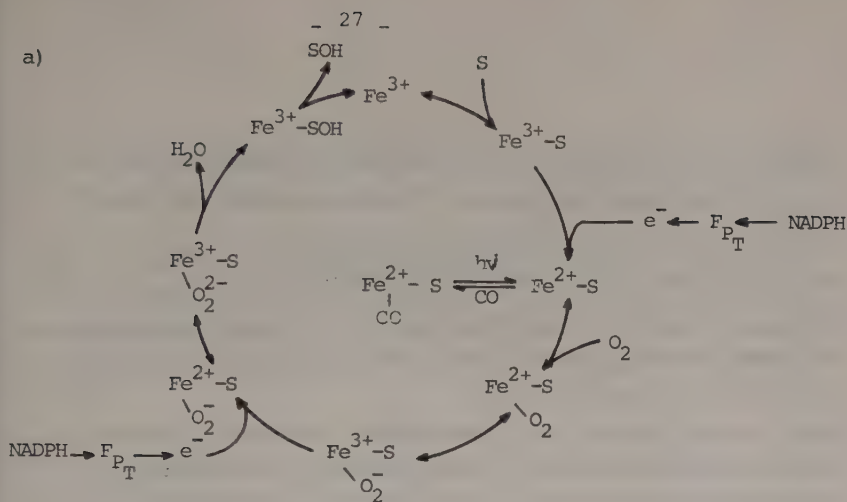
Monooxygenasen katalysieren die Einsetzung eines O-Atoms aus molekularem Sauerstoff in eine C-H Bindung unter gleichzeitiger Reduktion des zweiten O-Atoms zu Wasser*. Dabei entsteht ein hydroxyliertes Produkt bei aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen, oder eine Dealkylierung bzw. Deaminierung bei Verbindungen, bei denen das hydroxylierte Kohlenstoffatom einem O, N, bzw. NH, NH₂ benachbart liegt. Außerdem sind auch Sulfoxidation und N-Oxidation möglich.

Cytochrom P-450 kann auch unter hypoxischen Bedingungen Verbindungen durch Reduktivprozesse unter Bildung von Radikalen aktivieren (Ullrich, 1977). Diese Reaktionen haben einerseits eine entgiftende Wirkung auf Fremdstoffe und Pharmaka und erlauben diesen, den Organismus zu verlassen, andererseits können sie manche Verbindungen toxischer machen, indem instabile reaktive Produkte gebildet werden, wie Epoxide, Arenoxide, N-Hydroxyverbindungen und Carbene, die leicht mit Proteinen und Nukleinsäuren weiter reagieren können (Ullrich, 1977).

Die Terminaloxidase, hier Cytochrom P-450, ist ein Redox-System, das durch Übertragung von 2 Elektronen von NADPH den Sauerstoff in eine aktivierte Form überführt. Dabei spielt die Reduktase die Rolle eines Überträgers zwischen NADPH, einem 2 e⁻-Donator und P-450 einem 1 e⁻-Akzeptor. Die dritte Komponente des P-450-Systems, Phosphatidylcholin, übt eine strukturelle Rolle in der Aufrechterhaltung der aktiven P-450-Konformation aus und beschleunigt die e⁻-Übertragung von der Reduktase auf das Cytochrom.

Der Reaktionszyklus des Monooxygenase-Systems verläuft wahrscheinlich nach dem folgenden Schema (siehe Abbildung 1):

* Protonen- und Elektronendonator ist im allgemeinen NADPH.



b)

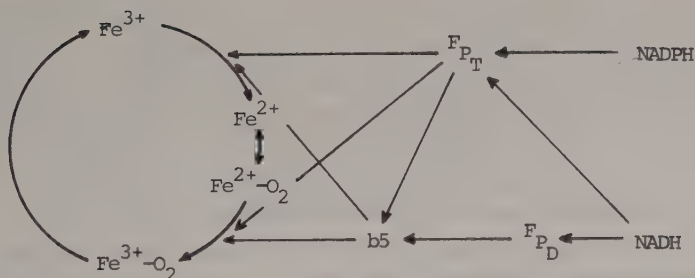


Fig. 1: Der Cyt. P-450 Redox-Zyklus.

a) Mechanismus der mikrosomalen Cyt. P-450 abhängigen Hydroxylierungen (nach Estabrook et al. 1971)

b) Wege des Elektrontransportes

S = Substrat. Fe^{2+} , Fe^{3+} , reduziertes bzw. oxydiertes

Cyt. P-450, F_{PD} , NADPH - Cyt. P-450-Reduktase.

$$F_{P_{\text{H}}}, \text{NADH} - \text{Cyt. b5-Reduktase, b5, Cyt. b5.}$$

- 1) Bindung des Substrates an das oxydierte Cytochrom P-450
- 2) Reduktion der NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase durch NADPH
- 3) Reduktion des Cytochrom P-450-Substrat-Komplexes bei der reduzierten NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase
- 4) Anlagerung des O_2 an den reduzierten P-450-Substrat-Komplex.
(An dieser Stelle kann sich auch CO anlagern und die nächsten Schritte hemmen.)
- 5) Reduktion des oxygenierten reduzierten P-450-Substrat-Komplexes mit dem zweiten e^- von NADPH via Reduktase, und "Sauerstoffaktivierung"
- 6) Zerfall des oxygenierten reduzierten Cytochrom P-450-Substrat-Komplexes in hydroxyliertes Produkt, oxydiertes Cyt. P-450 und H_2O .

Zur Vervollständigung dieser Darstellung des normalen Hydroxylierungszyklus muß erwähnt werden, daß in Anwesenheit von Reduktionsäquivalenten Cytochrom P-450 einem Redoxzyklus mit Bildung von Wasserstoffperoxid unterliegt, es ist der sogenannte Autooxidationsprozeß. Dabei wird nach Reduktion von Cytochrom P-450 das Peroxidanion O_2^- gebildet und abgespalten. Eine weitere Variante des Zyklus entsteht, wenn in Gegenwart von Substrat der zweite Reduktionsschritt, also die Sauerstoffaktivierung, erfolgt, ohne daß das Substrat hydroxyliert wird. Das ist die sogenannte Entkopplung. Aus der aktivierten Sauerstoffspezies wird auch H_2O_2 gebildet (siehe Ullrich und Kuthan, 1980). Aus dem Cytochrom P-450-Zyklus ist versucht worden, einen für die Hydroxylierung geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zu definieren. In Mikrosomen stößt man auf das Problem der verschiedenen vorhandenen Cyt. P-450-Spezies und der Anwesenheit endogener Substrate. Außerdem sind die in Frage kommenden xenobiotischen Verbindungen sehr unterschiedlich. Bei einer Reihe von "Typ I"-Substraten scheint die Reduktion des Cyt. P-450-Substrat-Komplexes geschwindigkeitsbestimmend zu sein (Björkhem, 1982). Bei anderen Substraten wiederum ist es die Übertragung des zweiten Elektrons auf den Oxykomplex, wie es aus der Stimulierung der Hydroxy-

lierung durch NADH (Elektronübertragung durch das Cyt. b5-System) hervorgeht (ibidem).

Mit Ausnahme von Substratbindung und Flavoproteinreduktion können unter Umständen alle anderen Schritte geschwindigkeitsbestimmend sein. Das hängt von Substrat, Induktion, Spezies, Geschlecht und Alter der Versuchstiere ab (Björkhem, 1982).

Eine weitere ungeklärte Frage bleibt die der Natur des "aktiven Sauerstoffes". Molekularer Sauerstoff als ein Molekül mit einem Triplet Grundzustand reagiert kaum spontan mit organischen in einem Singlet Zustand liegenden Verbindungen, weil die Reaktion von Triplet- mit Singlet-Molekül ein spinverbotener Prozeß ist (Hamilton, 1974). In Oxygenasen, die ein Übergangsmetall als prosthetische Gruppe besitzen, überlappen sich die ungepaarten elektronischen Orbitale von O_2 und vom Metall, so daß der resultierende Komplex mit einem Singlet organischen Substrat reagieren kann. Dabei kann theoretisch die reaktive Sauerstoffspezies ein Metalloxykomplex, ein chemisch modifiziertes Peroxid oder ein OH-Radikal sein (O'Brien, 1982). An diesem Punkt trennen sich die wissenschaftlichen Interpretationen über die Natur des Reaktionsmechanismus beim MOS.

Aus der Ähnlichkeit mit den Carbenreaktionen hat sich die Hypothese eines "oxenoiden" Mechanismus entwickelt, wobei ein O Atom in einem Transitionszustand nach heterolytischer Spaltung des O_2 -Moleküls durch elektrophile Substitution direkt in eine C-H-Bindung eingeführt wird (Ullrich, 1972, 1977; O'Brien, 1982). Diese Spezies könnte eine $[Fe^{4+}-O]$ -Bindung oder eine $[Fe^{3+}-O-OH]$ - als Persäure oder Peramid modifizierte Spezies sein (Hamilton, 1974). Diese Hypothese findet eine Unterstützung in der Tatsache, daß die Reaktivität der aliphatischen Kohlenwasserstoffe am höchsten bei tertiären CH-Bindungen ist, und vor allem in der Substituentenwanderung ("NIH Shift"), die bei der Hydroxylierung von Aromaten beobachtet wird (Jerina et al., 1973). Sie erklärt sich durch die Bildung eines Arenoxiden als Zwischenprodukt

und seine Umbildung zum hydroxylierten Produkt. Es ist jedoch bisher kein enzymatisches Oxenoidreagenz isoliert oder identifiziert worden. Zur Unterstützung dieser Hypothese werden die Reaktionen von Substraten des MOS mit chemischen Modellsystemen getestet:

- Udenfrienches Modell $O_2/Fe^{++}/\text{Ascorbinsäure}/\text{EDTA}$
- Ullrich's Systeme $O_2/Sn^{+2}/HPO_4^{=}$
 $O_2/Fe^{++}/\text{Mercaptobenzoat}$
- Hamiltonsches System: $H_2O_2/Fe^{+++}/\text{Catechol}$.

Diese Modellsysteme ahmen mehr oder weniger die vom MOS katalysierten Reaktionen mit einem beliebigen Substrat nach, geben aber keine klare Einsicht in den Mechanismus (Matzuma, 1977).

Manche Reaktionen lassen sich durch einen Radikalmechanismus besser erklären. In dieser Hypothese wird die Bildung einer $[Fe^{IV} \dots O^-]^{3+}$ - oder $[Fe^V \dots O^{2-}]^{3+}$ -Spezies postuliert, die ein H-Radikal vom Substrat abstrahiert und als Hydroxyradikal mit dem C-Radikal rekombiniert (Groves, 1980).

In dem Fall, wo eine eisengebundene Persäure oder ein Peroxid als Zwischenstufe vorausgesetzt wird, wird eine homolytische Spaltung der O-O-Bindung vorgeschlagen, die ein Carboxy-Radikal freisetzt. Dieses ist die Spezies, die das Substrat angreift (White und Coon, 1980). Für die Verfechter des Radikalmechanismus ist die Regioselektivität der vom MOS katalysierten Reaktionen auf die Alkane mit der direkten Insertion eines O-Atoms in die CH-Bindung unvereinbar; es muß einen Zweischrritteprozeß geben (Groves, 1980). Außerdem sprechen für einen Radikalmechanismus die Stereospezifität von mancher Hydroxylierung (Fish et al., 1977; Kimmel et al., 1980; Groves, 1980), sowie der bei bestimmten Substraten auftretende intramolekulare Isotopeneffekt (Groves et al., 1978). Zur Unterstützung dieser These stellt ein modifiziertes Fenton-System ($H_2O_2/Fe^{II}/HClO_4$ in Acetonitril statt in wässriger Lösung) ein gutes chemisches Modell für das MOS dar.

Danach soll der aktive Sauerstoff eine mäßig reaktive, elektrophile, wasserstoffabstrahierende Spezies sein, die Kohlenwasserstoffe in einem Zweischnitteprozeß hydroxyliert (White und Coon, 1980).

Der Artikel von Sligar et al., 1984, bietet einen umfangreichen Überblick über die Problematik der Cyt. P-450-Katalyse. Die verschiedenen Möglichkeiten für den "aktiven Sauerstoff" werden in Fig. 2 dargestellt.

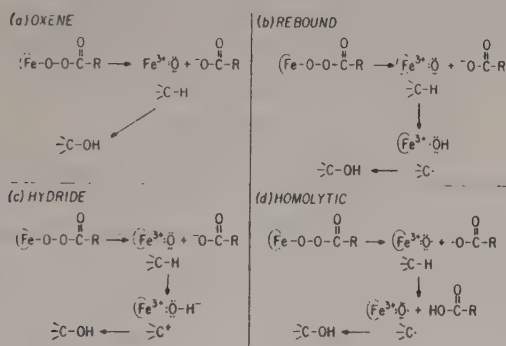


Fig. 2: nach Sligar et al. 1984

Beispiele der Sauerstoffaktivierung, die zur Substrathydroxylierung führen könnten.

a-c) heterolytische Spaltung der O-O-Bindung, d) homolytische Spaltung.

Auch Capdevila et al. (1984) kommen zu dem Schluß, daß beide Reaktionsmechanismen wirken. In Abhängigkeit von der Natur des Substrats wird der eine oder andere katalytische Weg bevorzugt. Heterolytische Spaltung kann zu einem oxenoiden Komplex, der Epoxide auf Aromaten oder Olefinen anbringt, oder zu einer H-abstrahierenden Spezies, die die Hydroxylierung von Aliphaten vollbringt, führen.

Homolytische Spaltung der O-O-Bindung könnte vorkommen, wenn das Substrat in der Lage ist, ein Elektron, d.h. ein H-Radikal abzugeben (Fig. 3).

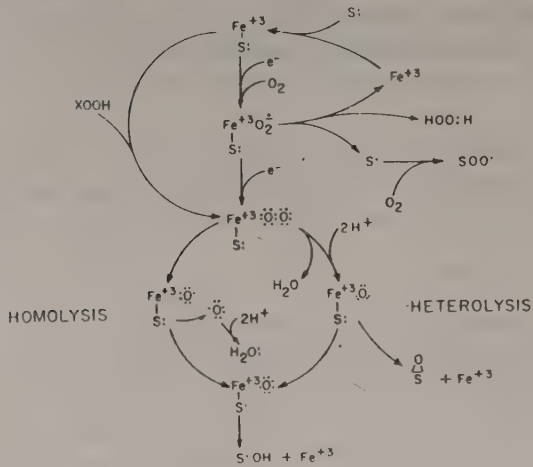


Fig. 3: Eine neue Interpretation des katalytischen Zyklus von Cyt. P-450 (Estabrook et al. 1982)

3. Meßmethoden: Analytik der Organobleiverbindungen

Die Wahl und Optimierung der analytischen Methode zur Bestimmung von Produkten des mikrosomalen Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ wurde unter den folgenden Gesichtspunkten angestrebt:

- Die Methode sollte die ionischen Produkte spezifisch oder ausschließlich erfassen.
- Die Produktgewinnung aus dem biologischen Ansatz sollte mit der Meßmethode vereinbar sein.
- Die Höhe der Ausbeuten sollte über einen breiten Konzentrationsbereich (1 bis 1000) konstant bleiben.
- Die Analytik sollte reproduzierbar sein.

Aus den quantitativen Nachweismethoden zur Bestimmung von Blei und Organobleiverbindungen, die existieren, habe ich die Colorimetrie mit Dithizon, die Polarographie mit tropfender Quecksilberelektrode und die Flammenatomabsorption getestet. Entscheidend für die Wahl der Nachweismethode wurde jedoch die Beseitigungsprozedur des biologischen Materials und die Produktgewinnung.

Die Untersuchungen wurden an Bleitetraethyl als Substrat vorgenommen.

3.1 Produktisolierung

Die Beseitigung des biologischen Materials nach Reaktion des Tetraorganobleis mit den Mikrosomen erfordert milde Bedingungen, um das nicht umgesetzte Substrat vor weiterer Zersetzung zu schützen und Kontaminierung des enzymatisch gewonnenen Produktes zu verhindern. Daher sind übliche Fällungsverfahren mit konzentriertem T.C.A. (Trichloressigsäure) oder chemische Veraschung mit Perchlorsäure und Salpetersäure undurchführbar.

Tabelle 2: Wirkung der Trennung von biologischem Material auf die Produktwiedergewinnung

Isolierungs- Verfahren	Produktwieder- gewinnung Ausbeute	Wiedergewin- nung, Nach- weisgrenze	Kontaminier- ung durch Pb(R) ₄	Reprodu- zierbar- keit	pH	Zeitauf- wand	Matrixbestandteile (qualitativ)
Fällung Ba(OH) ₂ +ZnSO ₄ (nach Cremer)	Produkt 2·10 ⁻⁶ M 50% 2·10 ⁻⁵ M 70% 2·10 ⁻⁴ M 80% Verdünnung der Probe 1:1	10 ⁻⁶ M	nicht nach- weisbar	schlecht	6	20 min/ 12 Proben	gelöste organische Mole- küle, Ionen Cl ⁻ , PO ₄ ³⁻ , K ⁺ Na ⁺ Mg ⁺⁺ Ba ⁺⁺ , Zn ⁺⁺
Fällung UO ₂ (CH ₂ CO ₂) ₂	2·10 ⁻⁶ M 70% 2·10 ⁻⁵ M 70-75% 2·10 ⁻⁴ M 75-80% Verdünnung der Probe 1:1	10 ⁻⁶ M	nicht nach- weisbar	schlecht	6	20 min/ 12 Proben	wie oben - Ba ⁺⁺ Zn ⁺⁺ + UO ₂
Hitze Denatu- rierung + Ul- trazentrifu-	Abhängig von Mikrosomenkonz. 1 mg/ml 10% 0,5 40% 0,2 100% Verdünnung der Probe 1:5	- keine Verluste keine Verdünnung der Probe	ja	schlecht	8	120 min/ 6 Proben	Ionen aus dem Puffer, gelöste organische Mole- küle, Spuren von Lipi- den und Proteinen (Ribosome)
Hitze Denatur- + Millipore Filtration	unter 10 ⁻⁶ M 90% über 10 ⁻⁶ M 90-100%	keine Verluste keine Verdünnung der Probe	nicht nach- weisbar	gut	8	10 Std./ 10 Proben	Ionen und gelöste organische Moleküle
Ansäuerung + Chromatogra- phie über Extrelut®	Bei jeder Konz. 100%	keine Verluste keine Verdünnung der Probe	nicht nach- weisbar	gut	3-3,5	15 min/ 12 Proben	Wie oben + Fe ⁺⁺⁺ , Cu ⁺⁺ Al ⁺⁺⁺ , Si ⁺⁺ von Extre- lut®

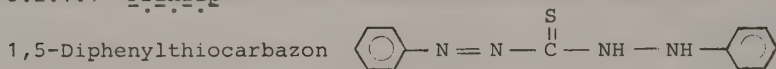
3.1.4 Chromatographie über Extrelut®

Der Reaktionsstop erfolgt durch Ansäuerung mit HCl bis pH 3 (100 µl HCl 2,5 M auf 5 ml Probe) und der Ansatz wird über eine mit 1,5 g Kieselgur (Extrelut®, Merck A.G., Darmstadt) gefüllte Glassäule (10 x 1 cm) filtriert. Dabei wird die Säule durch die mikrosomale Suspension durchtränkt und nach 10 min mit destilliertem Wasser verdrängt, 2-3 ml Filtrat werden gesammelt.

3.2 Analytik des Bleiabbauproduktes

3.2.1 Colorimetrische Bestimmung mit Dithizon

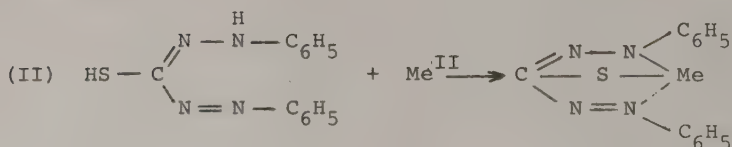
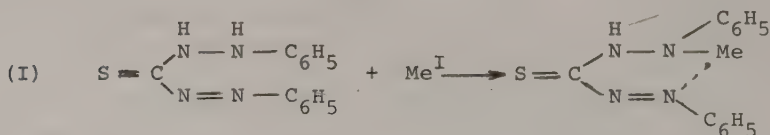
3.2.1.1 Prinzip



M.G 256,33

Dithizon reagiert mit einer Anzahl von Schwermetallionen um Komplexverbindungen zu bilden, die stark gefärbt sind.

Es gibt zwei Klassen von Dithizonaten, je nach Bildung eines Keto- oder eines Enolkomplexes mit dem Metallion.



Manche Metallionen bilden primäre sowie sekundäre Dithizonate unter pH-Abhängigkeit. Wie Dithizon selbst sind die Dithizonate wasserunlöslich. Sie werden mit Tetrachlorkohlenstoff oder Chloroform extrahiert. Das Zusammenspiel zwischen pH-Abhängigkeit und Löslichkeitsunterschied und zwischen freien Metallionen und Dithizonaten erlaubt die Bestimmung verschiedener Metalle nebeneinander. Allerdings überlappen sich die Meßbereiche von Metallen, aber diese Störungen können zum Teil durch weitere Komplexbildner ausgeschaltet werden (Iwantscheff, 1972).

Anorganisches Blei bildet ein sekundäres Dithizonat mit Absorptionsmaximum 510-520 nm. Organische Bleiionen können es auch, Dialkylbleiionen im Bereich 480-500nm, Trialkylbleiionen zwischen 420 und 440 nm.

3.2.1.2 Dithizon-Bleibestimmung nach Cremer (1957, 1959)

Am Anfang dieser Arbeit habe ich die schon vorhandene Meßmethode von Cremer für die Bestimmung von $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ aus dem Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ in Leberhomogenaten oder in der mikrosomalen Fraktion übernommen. Das biologische Material wurde durch Fällung mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und ZnSO_4 beseitigt (s. 3.1.1.1). Der klare Überstand der Zentrifugation wurde mit einem Borat-E.D.T.A Puffer versehen und mit einer Dithizonlösung in HCCl_3 geschüttelt.

Die Absorption wurde bei 610 nm (Absorptionsmaximum von Dithizon) gegen eine Kontrolle ohne Blei gemessen. Danach wurden die beiden Küvetteninhalte angesäuert und die Messung noch einmal gemacht. Die Extinktionsdifferenz entspricht der Menge an verwendetem Dithizon und daher der Bleitriäthylkonzentration.

Es ist mir nicht gelungen, die Messung so zu wiederholen, wie sie beschrieben worden ist, denn in demselben pH-Bereich komplexiert das überschüssige Zink aus der vorangegangenen Fällung. Nach Cremer sollen die Zn-Ionen durch E.D.T.A maskiert werden. Nach meiner Erfahrung ist das jedoch nicht der Fall. Obwohl das Absorptionsmaximum von Zn^{++} bei 540 nm und das von $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ unter diesen Bedingungen bei 435 nm liegt, hilft die direkte Messung

bei dieser Wellenlänge nicht, weil der starke Zn^{++} -Peak die $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ Extinktion überdeckt.

3.2.1.3 Dithizonbestimmung von Trialkylbleiverbindungen nach Henderson und Snyder (1961).....

Die Zinkinterferenz wird durch Anwendung einer cyanidhaltigen Lösung beseitigt. Unter diesen Bedingungen könnten nur Fe und Mn stören, wenn vorhanden.

Ansatz: 5 ml Probe nach Fällung von biologischem Material wird mit 2 ml einer ammoniakalischen Cyanid enthaltenden Lösung gemischt (Ammoniak 12,35 M, $\text{KCN } 6 \cdot 10^{-2}$ M, $\text{Na}_2\text{S } 0,2$ M, $\text{NaK } (\text{CO}_2\text{CHOH})_2 4 \text{ H}_2\text{O } 4,25 \cdot 10^{-2}$ M). Diese Mischung wird mit 2,5 ml Dithizon 0,006 % in Chloroform 1min geschüttelt. Die Phasen werden durch Abzentrifugieren getrennt und die Extinktion bei 424 nm gemessen. Nach Zugabe von 0,2 ml Salpetersäure 1,58 M, Schütteln und Zentrifugieren wird die Messung noch einmal vorgenommen. Aus der Differenz der beiden Messungen errechnet man den Bleigehalt (Kakác und Vejdelek, 1974).

3.2.1.4 Diskussion der Dithizon-Bestimmung

Bei dem Test der Empfindlichkeit der Dithizonbestimmung wurde die Produktisolierungsmethode in Frage gestellt, denn mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und ZnSO_4 als Fällungsmittel stellte sich heraus, daß das Trialkylkation zum Teil adsorbiert wird, und daß die Wiedergewinnung konzentrationsabhängig ist (s. Tabelle 2).

Daher wurden neue Trennungsvorfahren ausprobiert, die theoretisch und bis auf die Chromatographie mit Extrelut® im Zusammenhang mit der Dithizonbestimmung anwendbar sind. Der entscheidende Faktor ist dann die Empfindlichkeit der Produktisolierung (Tabelle 2). Zur Methode selbst soll gesagt werden, daß sie für den Zweck dieser Arbeit ausreichend empfindlich ist (Nachweisgrenze 10^{-7} M Blei). Dabei ist sie nicht leicht zu handhaben, wegen der relativen Instabilität der gebildeten Komplexe.

Ein Vorteil der Methode liegt darin, daß das Trialkylbleiprodukt theoretisch neben dem Tetraalkylbleisubstrat bestimmt werden kann. Das ist in dem Fall von Bestimmung an biologischem Material von geringerer Bedeutung, da eine direkte Messung nicht möglich ist. Das zelluläre Material, hier die Mikrosomen, muß beseitigt werden und das lipidlösliche Tetraalkylblei bleibt gänzlich in der Membran.

3.2.2 Polarographische Bestimmung

3.2.2.1 Prinzip (Proszt et al. 1967, Heyrovsky und Kuta, 1965).

Unter den elektrochemischen Methoden befaßt sich die Polarographie mit diffusionsbedingten Elektrolyseprozessen zwischen besonderen Elektroden. Es wird eine langsam ansteigende Spannung angelegt und die Stromspannungskurve in Abhängigkeit von dem Reduktionspotential des zu untersuchenden Ions aufgenommen. Dabei wird eine Quecksilbertropfenelektrode als Kathode und Arbeitselektrode verwendet, die durch ihre kleine Oberfläche leicht polarisierbar wird. Durch die permanente Neubildung von Tropfen wird gesichert, daß das Reduktionspotential konstant bleibt. Die Bezugselektrode darf nicht polarisierbar sein. Oft verwendet man eine großflächige Quecksilberelektrode. Der Stromfluß wird von einem stark konzentrierten Elektrolyten, in dem die zu untersuchenden Ionen gelöst werden, gewährleistet. Dadurch gelangen sie an die Tropfenelektrode ausschließlich durch Diffusion. Unter und über einem bestimmten Wert der angelegten Spannung fließt ein schwacher sogenannter Grundstrom. Wenn die Abscheidungs- spannung des untersuchten Ions erreicht wird, beginnt die Stromstärke plötzlich zu steigen und die Elektrolyse beginnt. Der erzeugte Diffusionsstrom ist der Konzentration des reduzierten Ions proportional. (Man mißt die Halbstufenpotentiale.) (siehe Fig. 4 a).

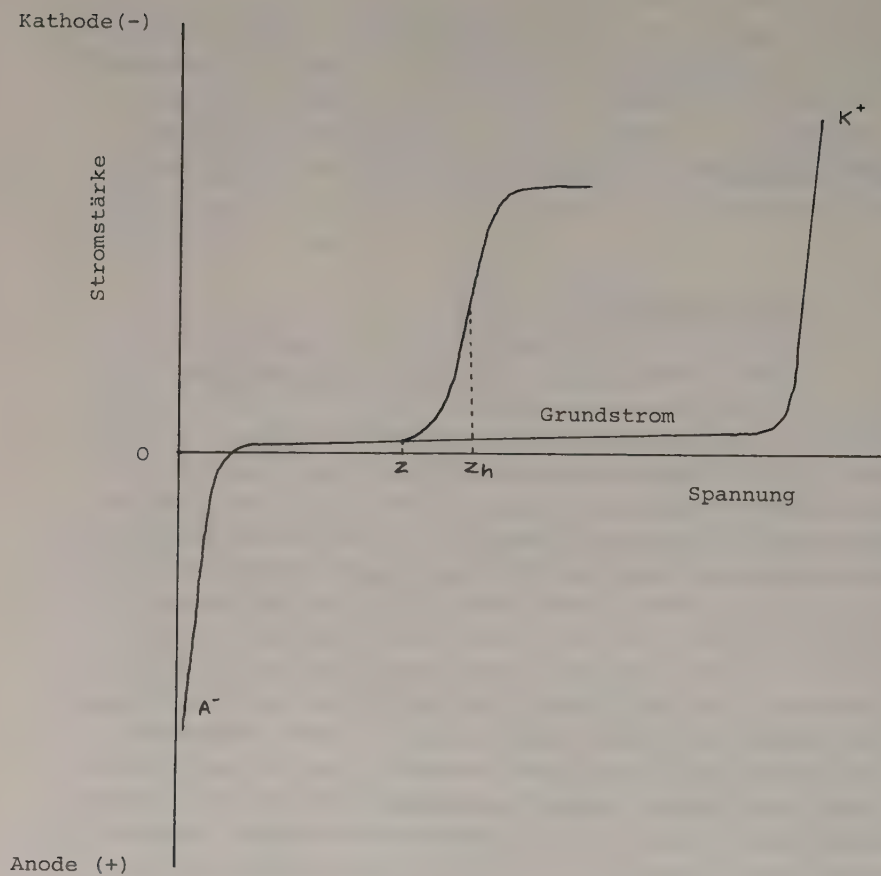
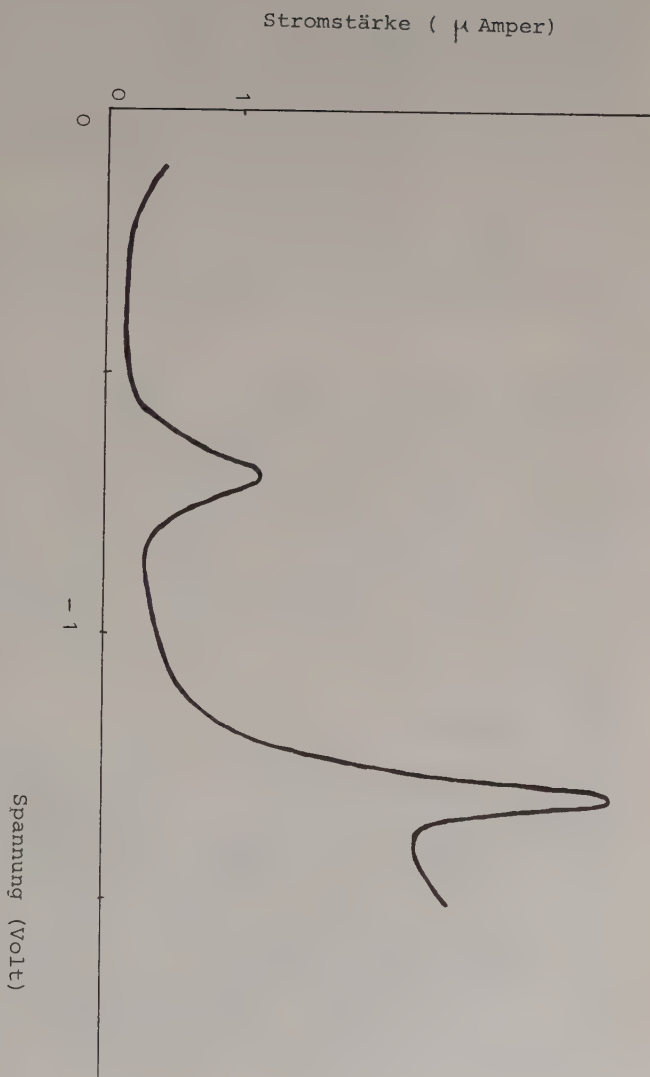


Fig. 4a: Polarogramm.

A^- , K^+ sind die anionischen und kathodischen Reduktionspotentiale des Grundelektrolytes A.K. Z = Zersetzungsspannung des untersuchten Ions, Z_h = Halbstufenpotential

Fig. 4b: Polarographie von $\text{Pb}(\text{Et})_3\text{Cl}$ (10^{-5} M) in 0,3 M Lithium Chlorid, pH 6.
Die Stromspannungskurve wird in Differentialpuls aufgenommen.



3.2.2.2 Polarographische Bestimmung von $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$

Trialkylkationen lassen sich polarographisch bestimmen (Costa, 1950, 1951), sogar in Gegenwart von Tetraalkylblei, das nicht reduzierbar ist (De Vries et al. 1959). Die Bindung an den Organoradikalen bewirkt eine Stabilisierung des organischen Ions gegenüber dem entsprechenden anorganischen Ion, so daß die Zersetzungspotentiale negativer werden. Bei Triethylbleihalogeniden wurden zwei Reduktionsstufen mit Halbpotentialen bei $-0,70$ und $-1,35$ V in Isopropanol 30% in H_2O (pH 7) festgestellt (Costa, 1950). Das erste Potential wird der Reduktion von $\text{Pb}(\text{Alk})_3^+$ zum Trialkylradikal zugeschrieben. Das zweite ist die Folge einer anderen Reaktion, die in der Literatur nicht weiter definiert wird. Das Auftreten der einen oder anderen Stufe mit $\text{Pb}(\text{Et})_3\text{OH}$ ist konzentrations- und pH-abhängig (Razuvaev et al. 1961).

In einem $0,3$ M LiCl-Puffer pH 6, habe ich mit Konzentrationen an $\text{Pb}(\text{Et})_3\text{Cl}$ von 10^{-7} bis 10^{-4} M zwei Stufen mit Halbmaxima bei $-0,7$ und $-1,33$ V registriert. Die zweite Stufe ist 3 mal höher als die erste und eignet sich zur Quantifizierung (Fig.4b). Die Messungen wurden mit einem Polarographen (Princeton Applied Research, U.S.A. Model A4A) durchgeführt. (Tropfzeit $0,5$ Sek., Spannung 0 bis $-1,5$ V, Stromintensitätsempfindlichkeit 2 bis 10 μA .) Die Probe in einem Volum von 50 ml wurde 30 min mit N_2 entlüftet und die Polarogramme wurden in Differentialmode aufgenommen.

3.2.2.3 Diskussion

Abgesehen von der verwendeten Prozedur zur Beseitigung des biologischen Materials ist die Lösung, in der sich das Trialkylbleiprodukt befindet, eine komplexe und nicht gut definierte Matrix, die unter anderem organische Moleküle wie Zucker, Cofaktore (Nukleotide) und Pufferanteile enthält, welche die polarographische Bestimmung beeinträchtigen. Die Matrix verursacht solche Störungen in der Aufnahme der Stromspannungskurven, daß der direkte Nachweis von Trialkylbleiionen nicht durchführbar ist. Die Proben können verascht werden und das Produkt als anorganisches Blei bestimmt werden.

Der Versuch mit der Dithizonmethode und der Polarographie einen geeigneten Test zu entwickeln wurde mit der Vorstellung vorgenommen, das Trialkylbleiprodukt spezifisch neben dem Tetraalkylbleisubstrat bestimmen zu müssen. Bei der obligatorischen Beseitigung der Mikrosomen bleibt das Substrat jedoch durch seine Lipidlöslichkeit auf der Membran, ohne das Produkt zu kontaminieren. Daher erübrigte sich die direkte Bestimmung von Trialkylblei und die Entscheidung für eine Meßmethode hing weiter nur von deren Vereinbarkeit mit der Isolierungsprozedur durch Extrelut® als schnellste und beste Methode ab.

3.2.3 Atomabsorptionsspektroskopie (A.A.S.)-Bestimmung

3.2.3.1 Prinzip (B. Weltz, 1975)

Es beruht auf der Eigenschaft von angeregten Atomen, Energiequanten aufzunehmen und wieder abzugeben. Wenn Atome thermisch oder elektrisch angeregt werden, senden sie die angenommene Energie in Form eines Emissionsspektrums. Wenn die Anregung durch Lichtenergie erfolgt, nehmen die Atome nur genau definierte Energiebeträge auf und man beobachtet ein Absorptionsspektrum. Jedes Element besitzt ein charakteristisches Spektrum mit einer gewissen Anzahl von Linien.

In der A.A.S. wird das Emissionsprinzip bei der Herstellung von Lichtquellen angewandt. Es handelt sich dabei um Spektrallampen, zum Beispiel Hohlkathodenlampen, die das interessierende Element enthalten. Das erzeugte Licht wird bei der entsprechenden Wellenlänge durch den Monochromator auf eine Absorptionszelle geschickt und vom untersuchten Element in atomarer Form absorbiert. In der Flammen-A.A.S. stellt diese Absorptionszelle eine kalibrierte Flamme dar, in der die Probe versprüht und thermisch dissoziiert wird. Die quantitative Bestimmung ergibt sich aus dem Beer-Lambertschen Gesetz der Proportionalität zwischen Absorption und Konzentration bei einer definierten Schichtdicke.

3.2.3.2 Anwendung bei der Bleibestimmung

Das Trialkylbleikation wurde mit einem A.A.-Spektrophotometer Pye Unicam SP 1900 bei der 283,31 nm Linie in einer Luft/Acetylen Flamme bestimmt. Optimale Bedingungen ergaben sich mit einem Lampenstrom von 6 mA, einer 0,3 mm Spaltbreite und einer Brennerhöhe von 1 cm. Eine Luft- und Acetylenzufuhr von 5 bzw. 1 l/min wurde für Messungen in wässriger Lösung gewährleistet. Erfolgte die Messung in organischem Lösungsmittel, so wurde die Gaszufuhr auf 4,5 und 0,25 l/min reduziert. Der Unterschied in der chemischen Struktur und den physikalischen Eigenschaften zwischen organischem und anorganischem Blei spiegelt sich in deren Atomisierungsvermögen wider.

Das $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ -Signal z.B. beträgt nur 80% dessen eines anorganischen Standards, so daß Trialkylblei-Standardlösungen zur Eichung benutzt werden müssen. Bei der zur Verfügung stehenden Apparatur liegt die Nachweisgrenze bei circa 10^{-6} M Blei.

Die A.A.S.-Bestimmung wird durchgeführt, nachdem das Trialkylbleiprodukt aus dem biologischen Ansatz, wie unter 3.1.4 beschrieben, isoliert worden ist. Durch die Extrelut®-Filtration enthält aber die Matrix zahlreiche Metallionen, insbesondere Alkali- und Erdalkalimetalle, sowie Aluminium, Silicium, Eisen und Kupfer aus dem Säulenmaterial. Es werden bis zu 30% positive Interferenzen auf das A.A.S.-Signal beobachtet. Die Bildung von Metallkoordinaten mit geeigneten Komplexbildnern ist eine in der A.A.S. verbreitete Technik, um solche Interferenzen zu umgehen (siehe Malissa und Schöffmann, 1955). Die entstehenden Präzipitate werden aus der wässrigen Phase mit organischen Lösungsmitteln extrahiert (Bode und Fabian, 1958; Allan, 1961). Für anorganisches Blei unter anderem hat sich die Kombination von APDC* als Komplexbildner und MIBK** als organischem Lösungsmittel in der A.A.S. bewährt (Willis, 1962; Mulford, 1966).

* Ammoniumpyrrolidindithiocarbamat

** Methylisobutylketon

Damit wird Blei aus biologischem Material (Blut, Urin, Gewebe) einwandfrei durch Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Außerdem hat diese Technik über die Beseitigung der wässrigen Matrix und der störenden Ionen hinaus den Vorteil einer Empfindlichkeitserhöhung (Allan, 1961; Lemonds und McClellan, 1973). Vor allem bewirkt die geringere Viskosität des organischen Lösungsmittels gegenüber Wasser eine größere Probenaufnahme pro Zeiteinheit am A.A.S.-Gerät und somit die Zunahme der Absorptionssignale. Die Organobleisalze bilden auch Chelate. Bei der von Shapiro und Frey (1974) aufgestellten Liste der verwendeten Komplexbildner (Tabelle XI-15 S. 300-301) wird APDC nicht erwähnt. Die Extraktion mit dem System APDC/MIBK ist von mir mit $\text{Pb}(\text{Et})_3\text{Cl}$ und $\text{Pb}(\text{Met})_3\text{Cl}$ bis zur Konzentration von 10^{-2} M Blei getestet worden. Die Trialkylbleiverbindungen komplexieren mit APDC und werden vollständig in die organische Phase überführt. Dabei werden auch noch Fe und Cu coextrahiert, die jedoch mit der Bleibestimmung nicht interferieren. Die Alkalimetalle sowie Si und Al dagegen werden beseitigt. Das A.A.S.-Signal wird gegenüber dem in der wässrigen Probe dreimal erhöht.

Die Durchführung der Messung erfolgt folgendermaßen:

2 ml des Extrelut[®]-Filtrates werden zusammen mit 0,2 ml einer gesättigten APDC-Lösung und 2 ml MIBK in ein Röhrchen pipettiert, 1min geschüttelt und 10min bei 3000 g zentrifugiert. Die MIBK-Phase wird am A.A.-Spektrometer direkt gemessen und mit $\text{Pb}(\text{Et})_3\text{Cl}$ - bzw. $\text{Pb}(\text{Met})_3\text{Cl}$ -Eichlösungen in APDC/MIBK verglichen.

3.2.3.3 Diskussion

Da die im Reaktionsansatz nicht umgesetzten Tetraalkylbleimoleküle vollständig auf der Säule zurückgehalten werden, kann die bezüglich der verschiedenen Bleispezies unspezifische Atomabsorptionsspektroskopie ohne Bedenken eingesetzt werden. Besonders nach Überführung des Bleiabbauprodukts in eine organische Phase mit dem Extraktionssystem APDC/MIBK ergibt die Kombination der Extrelut[®]-Produktisolierung mit der A.A.S.-Bestimmung eine

schnelle und zuverlässige Analytik, die auf einem breiten Konzentrationsbereich zweckmäßig bleibt. Der Gebrauch des Lösungsmittels MIBK setzt die Nachweisgrenze bis $2-3 \cdot 10^{-7}$ M Blei herab. Diese Grenze kann theoretisch noch durch Einengung des Probenvolumens heruntergestellt werden.

Der analytische Teil dieser Arbeit ist bereits veröffentlicht worden (Ferreira da Silva und Diehl, 1983a).

4. Ergebnisse

Eine umfassende Darstellung des in vitro Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ durch das Monooxygenase-System liegt vor, während die Ergebnisse mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$ als Substrat unvollständig sind. Es liegt daran, daß beide Substrate hintereinander untersucht wurden und dabei die Arbeitsbedingungen sich änderten. Aus apparativen Gründen ist die Lichtreversion der Hemmung durch Kohlenmonoxid mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$ nicht gemessen worden, sondern nur die CO-Hemmung selbst wurde getestet. Eine erste Reihe von kinetischen Experimenten nach Induktion mit Phenobarbital und 3-Methylcholanthren und mit Mikrosomen von unbehandelten Tieren konnte nicht quantitativ ausgewertet werden, weil die Notwendigkeit mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$ Anfangsgeschwindigkeiten zu messen, nicht erkannt wurde. Da inzwischen der Umgang mit dem starken Karzinogenen 3-Methylcholanthren als ungenügend sicher eingestuft worden war aber keine Verbesserung der technischen Bedingungen durchführbar war, wurde auf diesen Teil der Untersuchung an $\text{Pb}(\text{Met})_4$ verzichtet.

Daher werden beide Substrate aus Gründen der Übersichtlichkeit getrennt aufgeführt.

4.1 Der mikrosomale Metabolismus von Bleitetraethyl in Rattenleber

4.1.1. Das enzymatische Material

Die Untersuchungen werden an männlichen Ratten (Spargue-Dawley, 180-220 g) durchgeführt. Nach Homogenisierung des frischen Lebergewebes zur Zellaufbrechung wird die vom endoplasmatischen Retikulum abgeleitete mikrosomale Fraktion durch Differentialzentrifugation gewonnen (Lu und Levin, 1972; Ferreira da Silva et al, 1983b). Anschließend werden die Mikrosomen in einem 30 %igen Glycerin-Puffer suspendiert und in diesem Zustand bleiben sie bei -20°C mindestens zwei Monate ohne Aktivitätsverlust haltbar.

Der mikrosomale Proteingehalt wird mit der von Peterson, 1977 modifizierten Lowry-Methode gemessen. Der Cytochrom P-450-Gehalt wird an einem Aminco-DW 2 Spektrophotometer nach der Prozedur von Omura und Sato, 1964, bestimmt.

In den Induktionsexperimenten werden Natriumphenobarbital (80 mg/kg, 3 Tage) bzw. 3 Methylcholanthren (20 mg/kg, 1 Tag) an die Tiere intraperitoneal verabreicht.

4.1.2. Optimierung der Meßbedingungen

4.1.2.1 Puffer und pH

Erfahrungsgemäß haben sich Phosphat- und Tris-Puffer zwischen 0,05 und 0,1 M bei Aktivitätsmessungen mit dem MOS bewährt. Je nach Substrat werden pH-Werte zwischen 7,4 bis 8 gewählt. Ich messe mit einem 0,1 M Tris-Puffer, weil es für die Durchführung der A.A.S.-Bestimmung günstiger als Phosphat ist, das unter Umständen mit Blei interferiert (Dagnall und West, 1964). Der optimale pH-Bereich liegt bei pH 8 (Fig. 5).

4.1.2.2 Produktbildung in Abhängigkeit von der Zeit

Fig. 6 zeigt den $\text{Pb}(\text{Et})_4$ -Umsatz als Funktion der Inkubationszeit. Die Reaktion ist mindestens 15min linear. Routinemäßig werden Reaktionszeiten von 5 oder 10min genommen.

4.1.2.3 Enzymatische Aktivität als Funktion der mikrosomalen Konzentration

Diese Bestimmung dient dazu, einen potentiellen Verdünnungseffekt zu erfassen. Da die spezifische Aktivität auf den Proteingehalt der Mikrosomen bezogen wird, muß ein Konzentrationsbereich gewählt werden, in dem Linearität zwischen Umsatz und Proteingehalt besteht. Fig. 7 zeigt, daß es der Fall ist bis 2,5 mg Prot/ml.

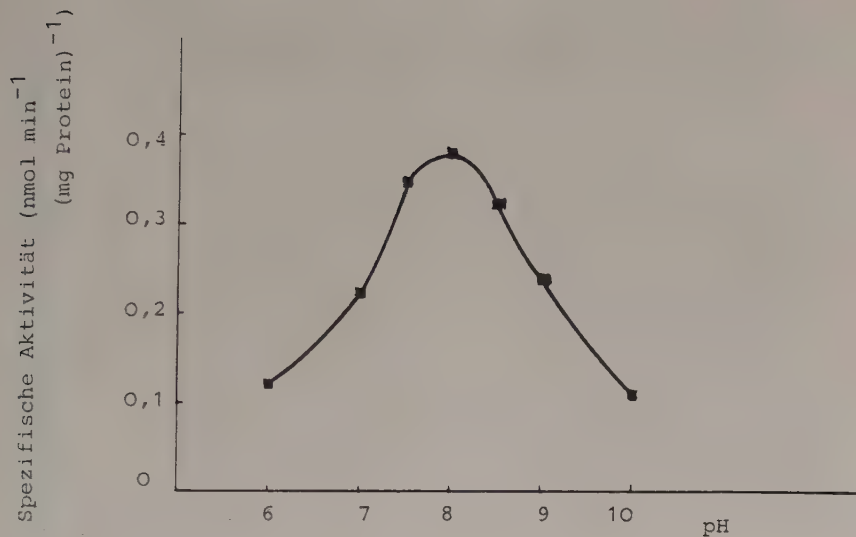


Fig. 5: Pb(Et)_4 Dealkylierung als Funktion des pH

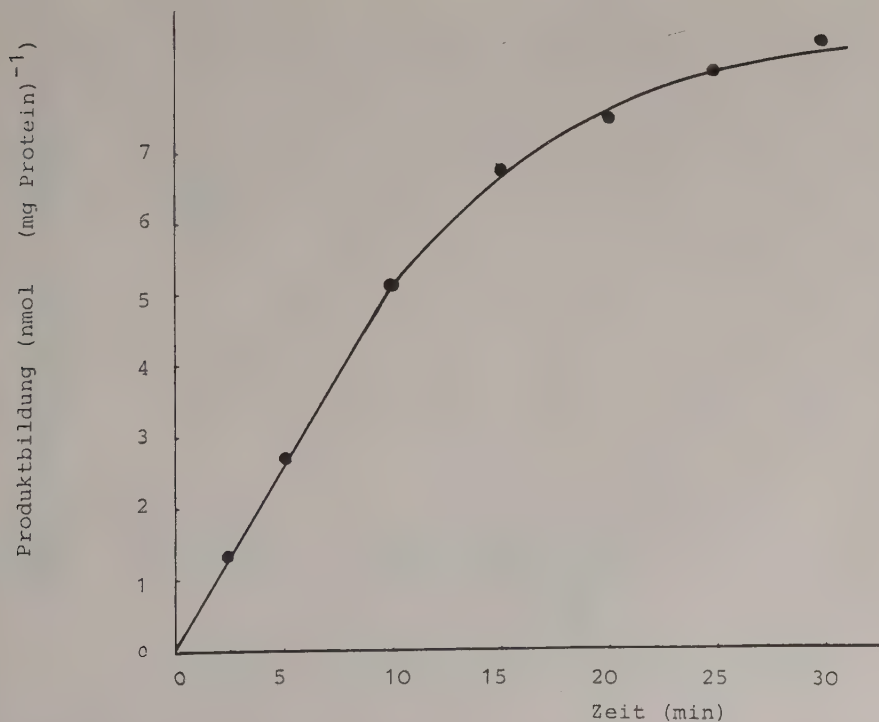


Fig. 6: Pb(Et)_4 Dealkylierung als Funktion der Reaktionszeit

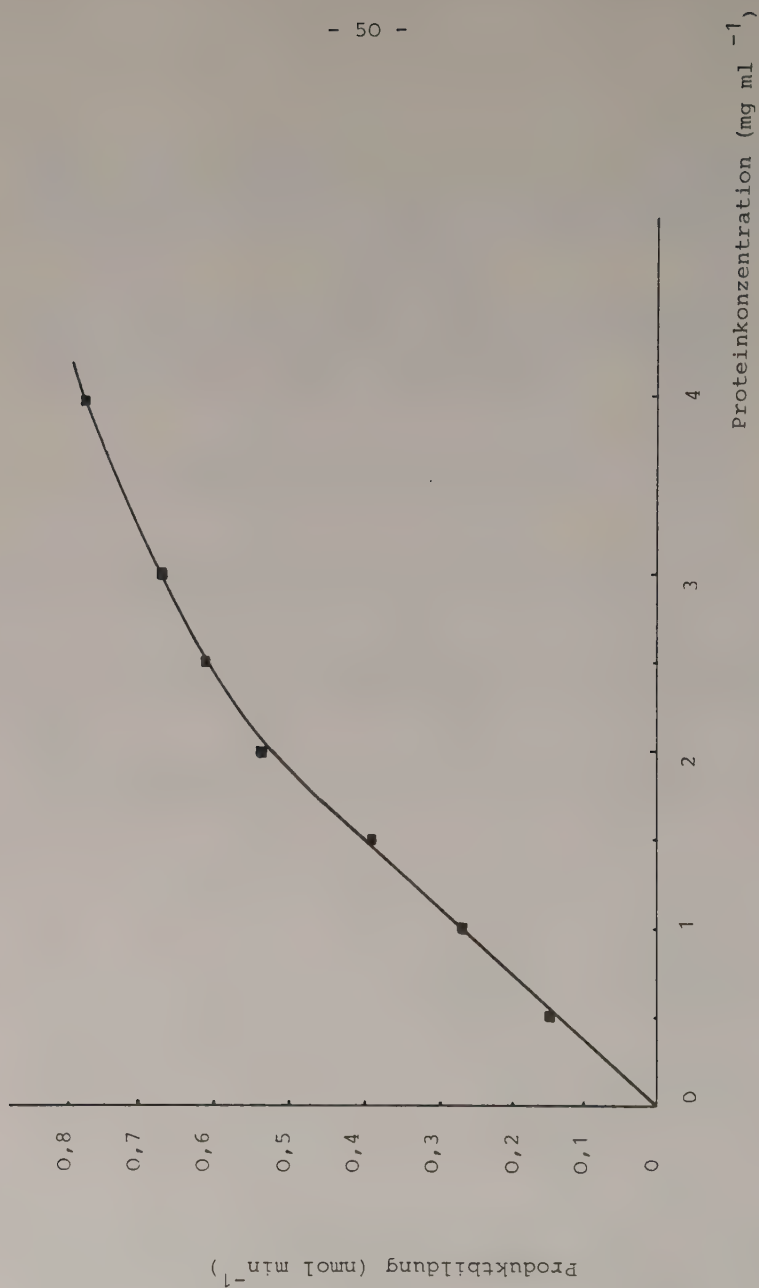


Fig. 7: Pb(Et)_4 Dealkylierung als Funktion der Konzentration des mikrosomalen Proteins.

Im optimierten Ansatz wird mit mikrosomalen Suspensionen gearbeitet, die 0,5 bis 1 mg Protein/ml enthalten.

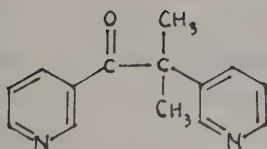
4.1.2.4 Cofaktorenanforderungen

Wie aus dem Cyt. P-450-Zyklus zu sehen ist (Fig. 1a und b), braucht das MOS zur Substratumsetzung unbedingt O_2 und NADPH, und es kann in Abhängigkeit von der Substratqualität Reduktionsäquivalente von NADH via Cyt. b5 akzeptieren, wodurch eine Erhöhung der spezifischen Aktivität gegenüber derjenigen mit NADPH allein beobachtet wird (Synergismus). Mit $Pb(Et)_4$ als Substrat wird keine synergistische Wirkung festgestellt. Auch die Zugabe von Magnesium-Ionen, die für die volle Aktivität notwendig sein sollen, zeigt keine Wirkung. Es ist anzunehmen, daß genug endogenes Magnesium in den präparierten Mikrosomen noch vorhanden ist (Tabelle 3).

4.1.2.5 Hemmstoffe

Der oxidative Abbau von $Pb(Et)_4$ wird durch CO gehemmt. Bei einem $CO:O_2$ Verhältnis von 4 ist die Hemmung total. Metyrapon, ein bekannter Hemmer der MOS-Reaktionen, wirkt deutlich (siehe Tabelle 3). β -Naphthoflavin, ein weiterer Hemmer des MOS, zeigt keine hemmende Wirkung selbst bei Mikrosomen von 3-MC-induzierten Tieren.

Metyrapon



β -Naphthoflavin

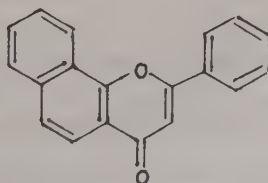


Tabelle 3: Cofaktorenanforderungen für die Deäthylierung von
Pb(Et)₄ (Mikrosomen von Kontrollratten)

Ansatz	Produkt nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹	Prozent der vollen Aktivität
Vollständiges System	0,27	100
- NADPH	0,0	0
- O ₂ + N ₂	0	0
- NADPH+NADH (1 mM)	0,015	5
- MgCl ₂	0,27	100
+ NADH (1 mM)	0,27	100
+ CO 80%, + O ₂ 20%	0	0
+ Metyrapone (5·10 ⁻⁵ M)	0,127	47
(5·10 ⁻⁴ M)	0,075	28
+ β-Naphtoflavon (5·10 ⁻⁴ M)	0,27	100

4.1.2.6 Messung der spezifischen Aktivität unter optimierten Bedingungen

Die mikrosomale Suspension (0,5 bis 1 mg Protein/ml) wird in 0,1 M Tris-Puffer pH 8 suspendiert. Zu dem 5 ml-Ansatz werden 5 µl einer molaren Pb(Et)₄ Lösung in Aceton zugegeben. Nachdem der Ansatz auf 37° C gebracht worden ist, wird die Reaktion mit 100 µl einer 25 mM NADPH Lösung gestartet. Die Reaktion wird 10min durchgeführt und mit 100 µl 2,5 N HCl gestoppt. Die Trennung des Abbauprodukts über Extrelut® folgt ohne Verzögerung, da im sauren Milieu Pb(Et)₄ sich auf chemischem Wege langsam weiter zersetzt.

4.1.3. Abbauprodukte des Pb(Et)₄ Metabolismus

4.1.3.1 Das Dealkylierungsprodukt

Aus den qualitativ angewandten analytischen Methoden, die erlauben, Triethyl- und Diethylblei nebeneinander zu bestimmen, wird fest-

gestellt, daß das Trialkylbleiion das einzige Dealkylierungsprodukt des in vitro Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ ist. In dieser Hinsicht stimmen die Ergebnisse mit denen von Cremer (1959), Stevens (1960), Bolanowska (1971) und Casida et al. (1971) überein. Andererseits weisen Prough et al. (1981) mit ihrer empfindlichen GC-Bestimmung der volatilen Produkte den Abbau von $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ nach. An Ethylen gemessen ist die spezifische Aktivität 10mal niedriger als die von $\text{Pb}(\text{Et})_4$. Da meine quantitative Meßmethode nicht erlaubt, $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ als Substrat zu testen, habe ich nach indirekten Hinweisen gesucht. $\text{Pb}(\text{Et})_3\text{Cl}$ stimuliert den NADPH- und den O_2 -Verbrauch der Mikrosomen nicht, aber doch die 1. Reduktion von Cyt. P-450 (siehe unten). Es bindet nicht klar erkennbar an Cyt. P-450, zeigt aber, gemessen am CO-Bindungsspektrum, in starken Konzentrationen (10^{-3} M) eine denaturierende Wirkung auf das Enzym. Doch $\text{Pb}(\text{Et})_3\text{Cl}$ 10^{-3} M hemmt die Ethoxycoumarindeethylierung zu 25% ($\text{Pb}(\text{Et})_4$ tut es zu 85%).

Schließlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ weiter abgebaut wird, es sei denn, daß das von Prough et al. gemessene Ethylen und Ethan von der Lipidperoxidation herkommt. Jedenfalls ist das nicht von Bedeutung für den Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Et})_4$.

4.1.3.2 Die Seitenkette

Wie schon erwähnt werden im mikrosomalen Metabolismus von Ethylmetallverbindungen Ethylen und Ethan gefunden (Prough et al. 1981).

Andererseits finden Kimmel et al. (1977) beim Metabolismus von Tributylblei- und Zinn-Verbindungen 1-Butanol und 1-Buten als abgespaltene Produkte nach α - bzw. β -C-Hydroxylierung.

Ich habe versucht Ethanol gaschromatographisch nachzuweisen, als mögliches Abspaltungsprodukt nach α -C-Hydroxylierung des $\text{Pb}(\text{Et})_4$. Ethanol wird in den enzymatischen Ansätzen sowie in verschiedenen Blindproben (Mikrosomen, Mikrosomen + NADPH, Mikrosomen + $\text{Pb}(\text{Et})_4$) gefunden, und zwar in unterschiedlichen Mengen von einer Probe zur anderen, so daß kein Vergleich zwischen vollständigem System

und Blindwerten möglich ist.

Das Vorhandensein von Ethanol in den mikrosomalen Suspensionen kann viele Ursachen haben: Verunreinigungen, Aktivität von Esterasen, Acetaldehydreduktion durch Alkoholdehydrogenase (ADH), vielleicht auch Hydroxylierung von Ethylen und Ethanol durch Cyt. P-450.

Außerdem wird Ethanol selbst durch Cyt. P-450 zu Acetaldehyd weiter oxidiert (Lieber et al. 1970), sowie von der ADH, wenn NAD^+ vorhanden ist, obwohl das pH Optimum von jeder Reaktion sie nicht miteinander interferieren lassen sollte. In geringerem Umfang kann auch die Katalase diesen Ethanol-Abbau in Anspruch nehmen (Teschke et al., 1977; Koop et al., 1984).

Diese Umstände machen eine auf den Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ bezogene Ethanolbestimmung außerordentlich schwer. Der Versuch sollte einer strengen methodischen Standardisierung der Proben und Blindproben unterworfen werden, außerdem sollten ADH und Katalase gehemmt werden und die mögliche Acetaldehydbildung durch Cyt. P-450 verfolgt werden.

Dies sprengt den Rahmen dieser Arbeit und es kann die Frage nicht beantwortet werden, ob $\text{Pb}(\text{Et})_4$ in α -Stelle der Alkylkette hydroxyliert wird und ob daraus Ethanol entsteht oder Ethylen bzw. Ethanol.

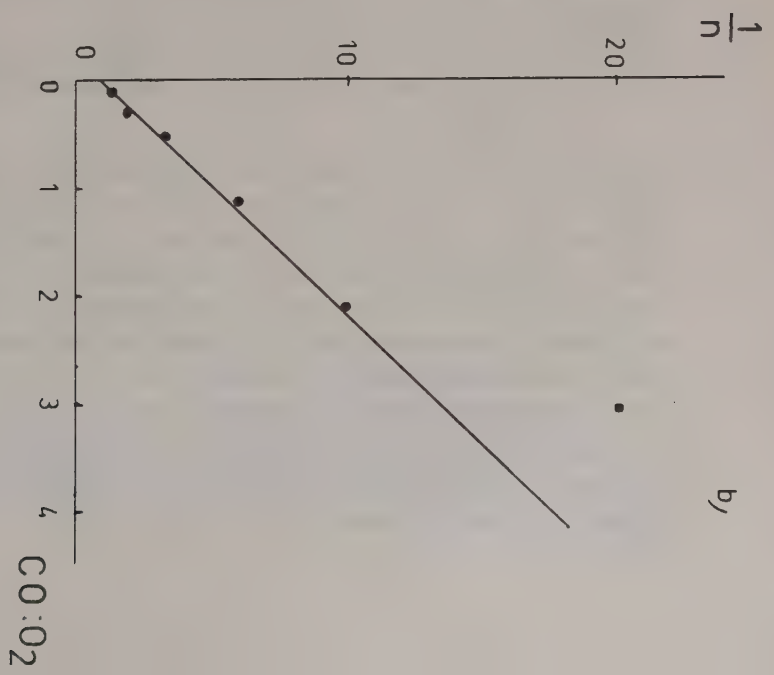
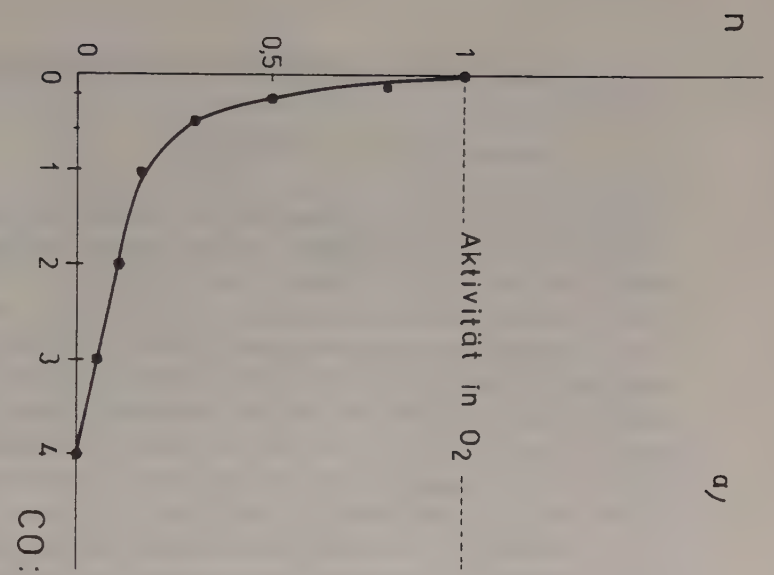


Fig. 8: Hemmung des Pb(Et)₄ Metabolismus durch Kohlenmonoxid.

a) Wirkung des CO:O₂ Verhältnisses auf die spezifische Aktivität, n (relative Aktivität)

b) Reziproke relative Aktivität, $\frac{1}{n}$ als Funktion des CO:O₂ Verhältnisses

4.1.4. Beteiligung des Cytochrom P-450 am Pb(Et)₄-Metabolismus

4.1.4.1 Apparatur und Meßbedingungen

Die Grundlagen zur Bestimmung des photochemischen Wirkungsspektrums sind von Rosenthal und Cooper (1967) gegeben worden. Experimentell stütze ich mich auf die Arbeit von Diehl et al. (1969). Der mikrosomale Ansatz (0,5 mg Protein/ml) wird in einer 5 ml-Quartzküvette (5 mm Schichtdicke) mit monochromatischem Licht bei Wellenlängen zwischen 410 und 490 nm bestrahlt. Lichtquelle ist eine Xenon-Hochdrucklampe (Osram XBO 1600 W). Die Wellenlängen werden mit einem Monochromator Typ CM 250, Schoeffel Instrument GmbH eingestellt. Die Halbwertsbreite beträgt 15 nm und die Bestrahlungsintensität liegt zwischen 3,5 und 6 mW/cm². Die Lichtintensität in der Küvette wird auf dem untersuchten Wellenlängenbereich mit einer Thermosäule gemessen und ein entsprechender Korrekturfaktor wird in der Berechnung der Lichtreversion der Aktivitätshemmung durch Kohlenmonoxid eingesetzt. Jede Probe wird bei 25° C unter standardisiertem Druck mit verschiedenen CO/O₂-Gemischen 10 min inkubiert (NADPH 10⁻⁴ M, Pb(Et)₄ 10⁻³ M). Die Produktquantifizierung erfolgt wie schon beschrieben.

4.1.4.2 Wirkung des CO/O₂-Verhältnisses auf die spezifische Aktivität

Der Pb(Et)₄-Abbau zeigt eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Kohlenmonoxid, da bei einem CO:O₂ Verhältnis von 2 die Aktivität nur noch 11% der Kontrolle ohne CO beträgt (Fig. 8a). Bei dem gleichen CO:O₂ Verhältnis hat die relative Aktivität mit Coumarin als Substrat denselben Wert (Schröder 1984), während der Hemmungsgrad von den anderen Substraten, die in dieser Hinsicht untersucht worden sind, niedriger ist: Ethoxycoumarin zeigt 22% relative Aktivität (ebda), Benzphetamin und Ethylmorphin sogar 42% (Cooper et al. 1979). Bei einem anderen Substrat mit hoher CO-Empfindlichkeit, Cyclohexan wird für ein CO:O₂ Verhältnis von ca. 0,5 25% Restaktivität angegeben (Diehl et al. 1969).

Bei demselben Verhältnis ist die relative Aktivität mit $\text{Pb}(\text{Et})_4$ oder Coumarin gleich 30%, Ethoxycoumarin 50%, Benzphetamin 63% und Ethylmorphin 70%.

Die reziproke relative Aktivität als Funktion des $\text{CO}:\text{O}_2$ Verhältnisses ist linear (Fig. 8b). Der Warburgsche Partitionskoeffizient (Rosenthal et al. 1967) definiert als

$$K_w = \frac{n}{1-n} \frac{\text{CO}}{\text{O}_2} \quad \text{mit } n = \text{relative Aktivität}$$

liegt bei 0,22 und auch in dieser Hinsicht zeigt $\text{Pb}(\text{Et})_4$ gemeinsame Eigenschaften mit Coumarin als Substrat ($K_w = 0,19$ (Schröder 1984)).

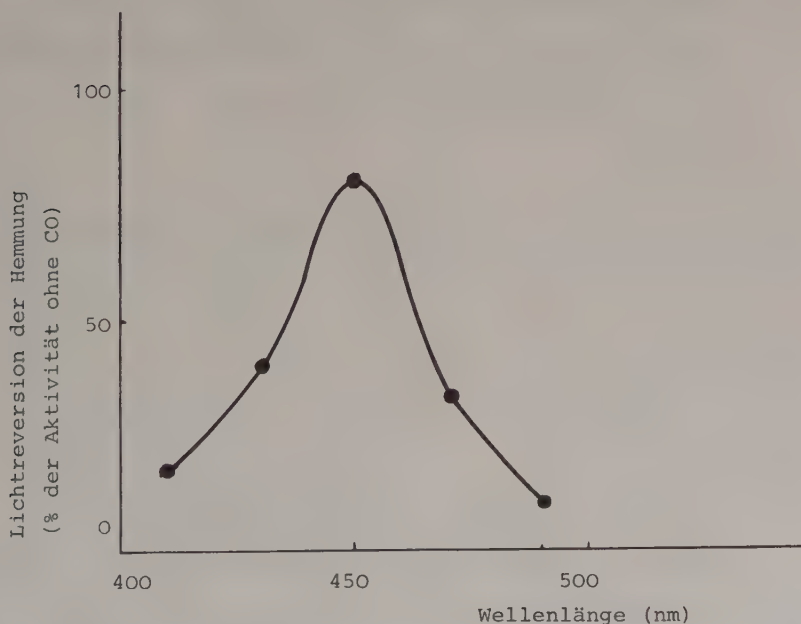


Fig. 9: Photochemisches Wirkungsspektrum der Reversibilität der CO-Hemmung für die $\text{Pb}(\text{Et})_4$ Dealkylierung

4.1.4.3 Das photochemische Wirkungsspektrum

Das Wirkungsspektrum wurde mit einem CO:O_2 Gemisch in einem Verhältnis von 2 gemessen. Wie aus Fig. 9 hervorgeht, wird bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 450 nm eine enzymatische Aktivität wiederhergestellt, die 80% der unter gleichen Bedingungen gemessenen Luftaktivität entspricht. Das Reaktivierungsspektrum deckt sich mit dem Absorptionsspektrum des reduzierten Cyt. P-450-CO-Komplexes und somit wird bewiesen, daß Pb(Et)_4 von Cyt. P-450 als der terminalen Oxidase des MOS metabolisiert wird.

4.1.5. Kinetik des Pb(Et)_4 -Abbaus bei den mikrosomalen MOS von Kontroll-, Phenobarbital-induzierten und 3-Methylcholanthren-induzierten Ratten

4.1.5.1 Induktion

Das mikrosomale MOS ist durch die Vielzahl der Isoenzyme mit überlappender Spezifität ein unscharf definiertes Enzymsystem. Andererseits ist die Gültigkeit der Untersuchungen von Substraten an gereinigten und rekonstituierten Enzymsystemen insoweit fragwürdig, als das Verhalten der Cyt. P-450-Moleküle gegenüber dem in der natürlichen Membran sich stark unterscheidet. Das Interesse, induzierte MOS zu verwenden, liegt darin, die Aktivität gegenüber einem Substrat bestimmten Isoenzymgruppen zuzuordnen. Trotz der Vielzahl der potentiellen Induktoren des MOS haben sich Phenobarbital und 3-Methylcholanthren, wenn auch willkürlich, als Standardinduktoren entwickelt. Dabei stellt Phenobarbital einen "Breitbandinduktor" dar, der die absolute Menge an Cyt. P-450 stark erhöht, aber die auf Proteingehalt bezogene Cyt. P-450-Konzentration mäßiger beeinflusst. 3-Methylcholanthren induziert eine in Kontrollmikrosomen nicht oder sehr wenig repräsentierte Cyt. P-450-Sorte, die sich durch einen CO-Komplex mit Maximum bei 448 nm kennzeichnet und, ohne die absolute

Menge an mikrosomalem Protein zu beeinflussen, synthetisiert wird. 3-MC-induziertes Cyt. P-450 bevorzugt als Substrate polyzyklische Kohlenwasserstoffe und aromatische Amine (N-Demethylierung), während aliphatische K.W. eher durch PB-Cyt. P-450 metabolisiert werden. Eine klare Trennung ist jedoch nicht möglich und viele Substrate werden von beiden Gruppen umgesetzt (z.B. Benzpyren, Ethoxycoumarin, p-Nitroanisol, Benzol ...).

4.1.5.2 Spezifische Aktivitäten

Pb(Et)₄ wird mit den Mikrosomen von PB- und von 3MC-induzierten Tieren dealkyliert. In beiden Fällen bewirkt die Induktion eine Erhöhung des Metabolismus gegenüber der Kontrolle. Die Aktivität ist ungefähr 6mal höher bei PB-Mikrosomen und 5mal höher bei 3MC-Mikrosomen (siehe Tabelle 4). Bezogen auf den Cyt. P-450-Gehalt statt auf den Proteingehalt ist die PB-Stimulierung nur noch das doppelte der Kontrolle und mit 3-MC wird dann die Aktivität 3mal höher. Das heißt, daß abgesehen von den absoluten Werten für die Aktivität der effektive Umsatz pro Cyt. P-450-Molekül höher ist in 3MC-Enzympräparationen als in PB. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob mehr Cyt. P-450 in den Metabolismus einbezogen wird oder ob Isoenzyme mit schnellerem turn-over induziert worden sind.

In Tabelle 5 sind zum Vergleich spezifische Aktivitäten des Ethoxycoumarin-Metabolismus dargestellt, die ein ähnliches Verhalten gegenüber Induktion zeigen.

4.1.5.3 Wechselwirkungen von Pb(Et)₄ mit Cyt. P-450

4.1.5.3.1 Bindungsspektren

Die Bindung eines Substrats an Cyt. P-450 kann anhand von spektralen Änderungen verfolgt werden, die eine Verschiebung des bei den Cyt. P-450-Molekülen vorhandenen High Spin-Low Spin-Gleichgewichtes durch Substratanlagerung ausdrücken. Wie aus Fig. 10 zu sehen ist, verursacht Pb(Et)₄ mit den drei getesteten Enzym-

Enzympräparation (M O S) und Induktionszustand	Kontrolle (K)	Phenobarbital (PB)	3-Methylcholanthren (3MC)
Spezifische Aktivitäten (Pb(Et) ₃ ⁺ -Bildung) nmol(min) ⁻¹ (mg Prot.) ⁻¹ nmol(min) ⁻¹ (nmol P-450) ⁻¹	0,3 - 0,5* 0,4 - 0,7*	2 - 2,5* 1 - 1,25*	1,5 - 2,3 * 1,4 - 2,2 *
Maximale Intensität der Bindung von Pb(Et) ₄ an Cyt.P-450 ΔA (mg Prot.) ⁻¹ ΔA (nmol P-450) ⁻¹	0,022 0,030	0,065 0,032	0,030 0,021
Dissoziationskonstante, Ks M	1,9 · 10 ⁻⁶	2 · 10 ⁻⁶	7 · 10 ⁻⁶
Michaelis-Menten-Konstante Km ₁ M Km ₂ M	(3,06 ± 0,42) · 10 ⁻⁵ (5,8 ± 1,1) · 10 ⁻⁴	(3,7 ± 0,8) · 10 ⁻⁵ (2,4 ± 0,7) · 10 ⁻⁴	(9,3 ± 1,4) · 10 ⁻⁶ (3,11 ± 1,16) · 10 ⁻⁴
Maximale Aktivitäten nmol(min) ⁻¹ (mg Prot.) ⁻¹ V _{max1} V _{max2}	0,052 ± 0,007 0,368 ± 0,072	0,350 ± 0,075 1,85 ± 0,50	0,100 ± 0,02 1,70 ± 0,25

Tabelle 4: Substratbindung, spezifische Aktivitäten und kinetische Parameter vom Pb(Et)₄-Metabolismus bei K-, PB- und 3MC-Mikrosomen

* Angegeben wird hier kein Mittelwert, sondern die Spanne der Messwerte über sämtliche von mir

Enzympräparation (M O S)
und Induktionszustand:

Enzympräparation (M O S) und Induktionszustand:		Kontrolle (K)	Phenobarbital (PB)	3-Methylcholan- thren (3MC)
Ratte eigene Daten	spez. Akt. nmol(min) ⁻¹ (mg Prot.) ⁻¹	0,25 0,34	3,3 1,6	1,2 1,1
	nmol(min) ⁻¹ (nmol P-450) ⁻¹			
Ratte (Ullrich et al. 1973)	spez. Akt. nmol(min) ⁻¹ (mg Prot.) ⁻¹	7-Ethoxycoumarin wird nicht umge- setzt	1,5 3 · 10 ⁻⁵ M (2,7 ± 0,5) · 10 ⁻⁵ -	4 (1 ± 0,5) · 10 ⁻⁶ (1,5 ± 1) · 10 ⁻⁶ (2,5 ± 1,5) · 10 ⁻⁵
	Ks M			
	Km ₁ M			
	Km ₂			
Maus (Ullrich et al. 1972)	spez. Akt. nmol(min) ⁻¹ (mg Prot.) ⁻¹	0,6-0,9 - (1 ± 0,5) · 10 ⁻⁶ 1 · 10 ⁻⁵	3x Kontrolle - 0,85 · 10 ⁻⁶ 2,5 · 10 ⁻⁵	keine Daten
	Ks M			
	Km ₁ M			
	Km ₂ M			

Tabelle 5: Spezifische Aktivitäten, Ks und Km Werte für die Dealkylierung von 7-Ethoxycoumarin (gemessen an dem Produkt 7-Hydroxycoumarin) in verschiedenen mikrosomalen Präparationszuständen, bei Mäuse- und Rattenleber.

präparationen ein "Typ I" Differenzspektrum, d.h. eine Erhöhung des High-Spin-Zustandes. Bei K- und PB-Mikrosomen liegen Maximum und Minimum bei 388-390 bzw. 420 nm mit einem isosbestischen Punkt bei 407 nm. Bei 3-MC-Mikrosomen ist eine leichte Blau-Verschiebung zu beobachten nach 385 bzw. 417 nm. In der Sättigung ist die Substratbindung bei PB-Mikrosomen am höchsten, während das Spektrum von 3-MC-Präparationen in seinem Umfang sich von der Kontrolle kaum unterscheidet (K: $\Delta A = 0,022$ /mg Protein bzw. $0,030$ / nmol P-450; PB: $\Delta A = 0,065$ / mg Protein bzw. $0,032$ / nmol Cyt. P-450; 3 MC: $\Delta A = 0,03$ /mg Protein, $0,021$ /nmol Cyt. P-450). Obwohl beim M.O.S. keine Rückschlüsse über den Umsatz eines Substrates aus dem Umfang der Bindung gezogen werden können (siehe Tabelle 4), geben die Bindungsmaxima Indizien dafür, daß die Stimulierung des $\text{Pb}(\text{Et})_4$ -Abbaus bei PB-Induktion zum Teil auf der Erhöhung des Cyt. P-450-Spiegels, zum geringeren Teil auf einer Erhöhung der Spezifität beruht, während bei 3MC die Spezifität bzw. Effektivität der neusynthetisierten Cyt.P-450 Moleküle dem größeren Umsatz zugrundeliegt.

4.1.5.3.2 Dissoziationskonstanten

Die Zunahme der Absorptionsdifferenz mit der Substratkonzentration ermöglicht es, das Bindungsgleichgewicht zu bestimmen. Die reziproke Darstellung der Sättigungskurve zeigt einen linearen Kurs. Das M O S verhält sich entsprechend dem Michaelis-Menten-Modell (Fig. 11). K_s Werte von $1,9 \cdot 10^{-6}$ M, $2 \cdot 10^{-6}$ M und $7 \cdot 10^{-6}$ M werden für K, PB und 3MC ermittelt. Diese Gleichgewichtskonstanten weisen hohe Affinitäten der beteiligten Cyt. P-450-Spezies für $\text{Pb}(\text{Et})_4$ auf, besonders bei Kontrolle und bei PB-Mikrosomen. Bemerkenswert ist es auch, daß die Heterogenität des Enzymmaterials bei der Bindung nicht durchscheint; es gibt keine gebrochenen Funktionen.

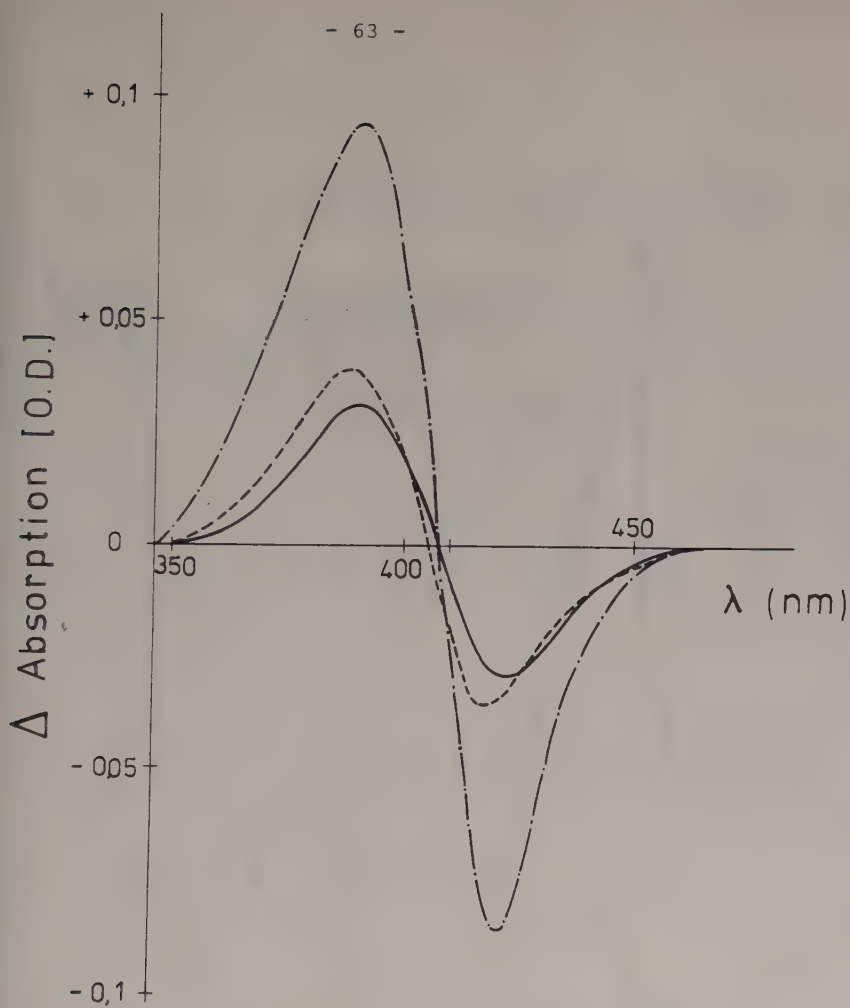


Fig. 10: Differenzbindungspektren von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ mit Cytochrom P-450 unter sättigenden Substratkonzentrationen. Mikrosomen von Kontroll- (—), Phenobarbital-induzierten (-.-) und 3-Methylcholanthren-induzierten (---) Ratten. (3 mg Protein pro ml)

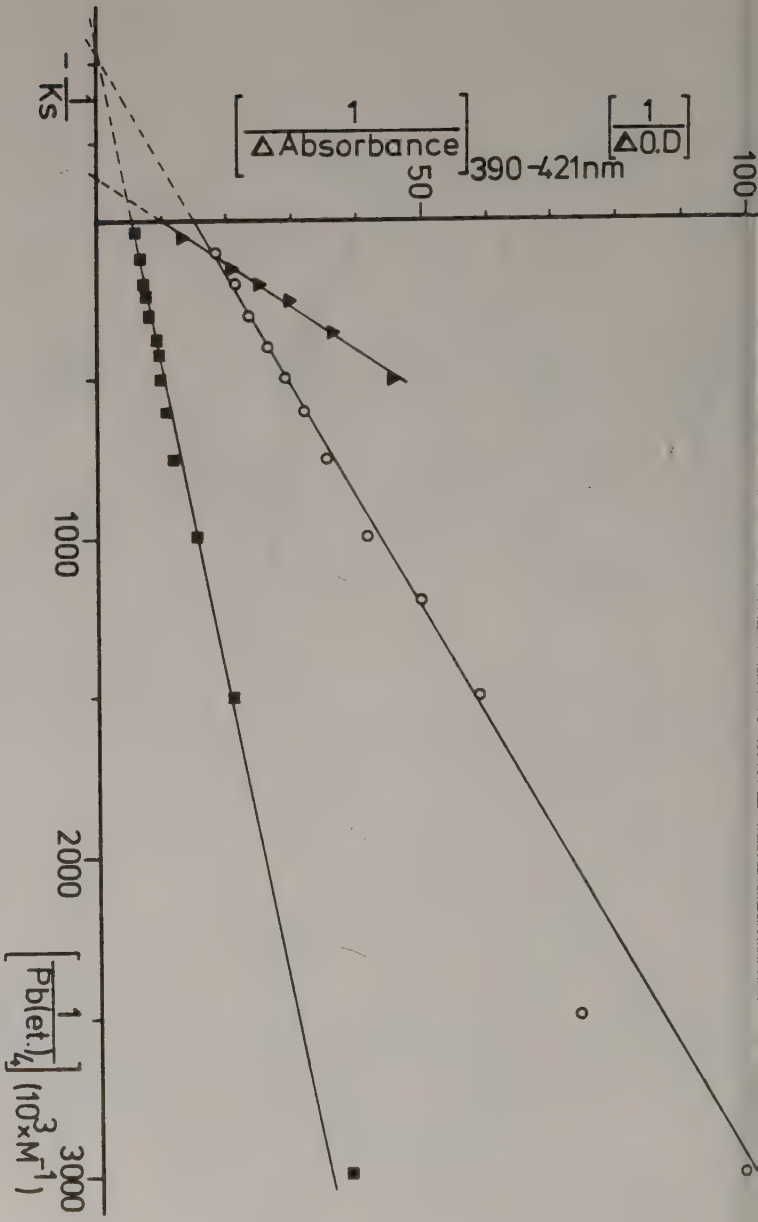


Fig. 11: Bindung von Pb(ET)_4 an Cyt. P-450

Reziproke Darstellung der Absorptionsdifferenz zwischen 390 und 420 nm
als Funktion der Substratkonzentration. Mikrosomen von Kontrollraten (○),
Phenobarbital-induzierten (■) und 3-Methylcholanthren-induzierten Ratten (▲).

4.1.5.4 Kinetik der Umsetzung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ zu $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$

4.1.5.4.1 Ansätze

Die Bedingungen sind unter 4.1.2.6 beschrieben worden. Die Substratkonzentrationen reichen von 10^{-6} M bis 10^{-3} M $\text{Pb}(\text{Et})_4$.

4.1.5.4.2 Bestimmung der K_m 's und $V_{\max}$

Bei den drei mikrosomalen Präparationen (K, PB, 3-MC) werden die enzymatischen Aktivitäten als Funktion der Substratkonzentration am besten als die Summe von zwei hyperbolischen Funktionen dargestellt, d.h. wir haben zwei überlagerte Reaktionen, die einer Michaelis-Menten-Kinetik folgen, und entsprechend die zwei Gleichungen:

$$(1) \quad v_1 = V_{\max_1} \frac{S}{K_{m_1} + S}$$

$$(2) \quad v_2 = V_{\max_2} \frac{S}{K_{m_2} + S} \quad S = \text{Pb}(\text{Et})_4\text{-Konzentration}$$

$$\text{mit } v_{\text{obs}} = v_1 + v_2$$

$$K_{m_1} \neq K_{m_2}$$

In der Auftragung nach Lineweaver-Burk ergeben sich zwei lineare Funktionen, aus denen die Parameter K_{m_1} , K_{m_2} , $V_{\max_1}$ und $V_{\max_2}$ errechnet werden können (s. Fig. 12).

$$(3) \quad \frac{1}{v_{\text{obs}}} = \frac{1}{v_1 + v_2} = \frac{\left(1 + \frac{K_{m_1}}{S}\right) \left(1 + \frac{K_{m_2}}{S}\right)}{V_{\max_1} \left(1 + \frac{K_{m_2}}{S}\right) + V_{\max_2} \left(1 + \frac{K_{m_1}}{S}\right)}$$

Gleichung (3) läßt sich umschreiben:

$$(4) \quad \frac{1}{v_{\text{obs}}} = \frac{1 + \frac{K_{m_1}}{S} + \frac{K_{m_2}}{S} + \frac{K_{m_1} K_{m_2}}{S^2}}{V_{\max_1} + V_{\max_2} + \frac{V_{\max_1} K_{m_2} + V_{\max_2} K_{m_1}}{S}}$$

Für $S \longrightarrow 0$ und im Bereich linearer Abhängigkeit zwischen $\frac{1}{v_{\text{obs}}}$ und $\frac{1}{S}$ kann man Gleichung (4) folgendermaßen annähern:

$$\frac{1}{v_{\text{obs}}} = \frac{K_{m1} + K_{m2} + \frac{K_{m1} K_{m2}}{S}}{V_{\text{max}1} K_{m2} + V_{\text{max}2} K_{m1}}$$

$$(5) \quad \frac{1}{v_{\text{obs}}} = \frac{1 + \frac{K_{m2}}{K_{m1}}}{V_{\text{max}2} + V_{\text{max}1} \frac{K_{m2}}{K_{m1}}} + \frac{K_{m2}}{V_{\text{max}2} + V_{\text{max}1} \frac{K_{m2}}{K_{m1}}} \cdot \frac{1}{S}$$

Wenn die Substratkonzentration klein ist, haben die aus den Schnittpunkten errechneten Größen folgenden Ausdruck:

$$K_{m1} \text{ "obs"} = \frac{K_{m2}}{1 + \frac{K_{m2}}{K_{m1}}}$$

$$V_{\text{max}1} \text{ "obs"} = \frac{V_{\text{max}2} + V_{\text{max}1} \frac{K_{m2}}{K_{m1}}}{1 + \frac{K_{m2}}{K_{m1}}}$$

Wenn $S \longrightarrow \infty$ und im linearen Bereich der Kurve wird der Ausdruck $\frac{K_{m1} K_{m2}}{S^2}$ in Gleichung (4) vernachlässigbar.

Es folgt:

$$(6) \quad \frac{1}{v_{\text{obs}}} = \frac{1}{V_{\text{max}1} + V_{\text{max}2}} + \frac{K_{m1} + K_{m2}}{V_{\text{max}1} + V_{\text{max}2}} \cdot \frac{1}{S}$$

Im Bereich hoher Substratkonzentrationen gilt dann:

$$K_{m2} \text{ "obs"} = K_{m1} + K_{m2}$$

$$V_{\text{max}2} \text{ "obs"} = V_{\text{max}1} + V_{\text{max}2}$$

Setzen wir jetzt die jeweils 2 bekannten Größen (Steigung und Schnittpunkt der y-Achse) aus (5) und (6) als ein System von 4 Gleichungen

$$\frac{Km_2}{V_{max_2} + V_{max_1} \frac{Km_2}{Km_1}} = a$$

$$\frac{1 + \frac{Km_2}{Km_1}}{V_{max_2} + V_{max_1} \frac{Km_2}{Km_1}} = b$$

$$\frac{Km_1 + Km_2}{V_{max_1} + V_{max_2}} = A$$

$$\frac{1}{V_{max_1} + V_{max_2}} = B$$

und berechnen wir Km_1 , Km_2 , V_{max_1} , V_{max_2}

$$\text{mit } B = \frac{1}{V_{max_1} + V_{max_2}} \Rightarrow V_{max_2} = \frac{1}{B} - V_{max_1}$$

$$\text{mit } A = \frac{Km_1 + Km_2}{V_{max_1} + V_{max_2}} \Rightarrow Km_2 = \frac{A}{B} - Km_1$$

$$\text{mit } b = \frac{Km_1 + Km_2}{V_{max_2} Km_1 + V_{max_1} Km_2} \Rightarrow V_{max_1} = \frac{A - b Km_1}{b(A - 2B Km_1)}$$

$$\text{mit } a = \frac{Km_2}{V_{max_2} + V_{max_1} \frac{Km_2}{Km_1}} \Rightarrow Km_1^2 = \frac{A}{B} Km_1 - \frac{aA}{bB}$$

Diese Gleichung hat dann zwei Lösungen: die eine ist Km_1 , die zweite sollte den Wert von Km_2 haben

$$Km_{1,2} = \frac{A}{2B} \pm \sqrt{\left(\frac{A}{2B}\right)^2 - \frac{aA}{bB}}$$

Die Werte werden in Tabelle 4 aufgeführt.

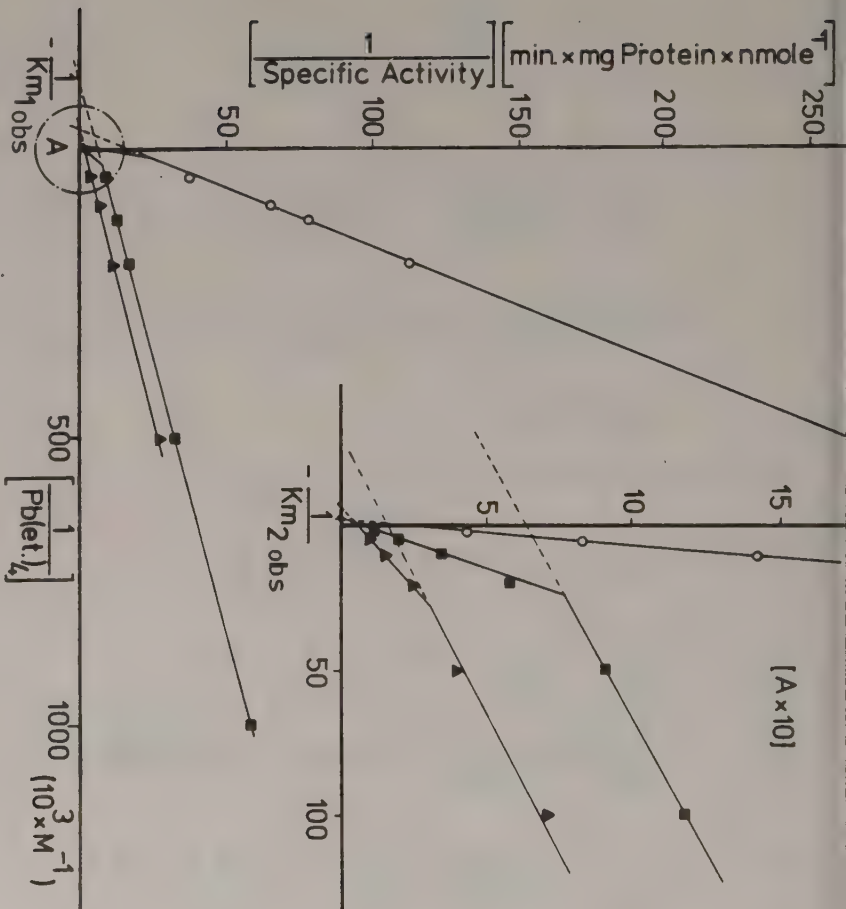


Fig. 12: Kinetik der Umsetzung von Pb(Et)_4 .

Reziproke Darstellung der spezifischen Aktivität als Funktion der Substratkonzentration.

(O) K-, (■) PB- und (▲) 3MC-Mikrosomen.

4.1.5.4.3 Interpretation der Daten

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ von verschiedenen Cyt. P-450 Subspezies umgesetzt wird. Wenn angenommen wird, daß die Km_1 für K- und PB-Mikrosomen und die Km_2 im Falle von PB- und 3MC-Mikrosomen jeweils einer identischen Isoenzymgruppe zugeordnet werden, sind es insgesamt mindestens vier verschiedene Subspezies. Innerhalb jedes Präparationszustandes sind zwei Isoenzymgruppen für den Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ verantwortlich. Der Gruppe mit einem niedrigen Km-Wert, die bei kleinen Substratkonzentrationen erfaßt wird, entspricht ein V_{max} -Wert, der nur zu einem geringen Teil der beobachteten spezifischen Aktivität beiträgt. Der Hauptteil des $\text{Pb}(\text{Et})_4$ Metabolismus wird von einem Pool Cyt. P-450-Moleküle übernommen, der einen höheren Km-Wert aufweist (Tab. 4). Ähnlich wird von einer zweiphasigen Kinetik bei Lebermikrosomen von Mäusen und Ratten mit 7-Ethoxycoumarin als Substrat berichtet (Ullrich u. Weber, 1972; Ullrich et al., 1973). Im Falle von PB-induzierten Ratten scheint die Km_1 für $\text{Pb}(\text{Et})_4$ ($3,7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) mit der Km für 7-Ethoxycoumarin ($2,7 \pm 0,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) zu korrelieren, denn 10^{-4} M $\text{Pb}(\text{Et})_4$ bewirkt 85% Hemmung auf den Abbau von 7-Ethoxycoumarin zu 7-Hydroxycoumarin, während letztere Verbindung nur 10% des $\text{Pb}(\text{Et})_4$ -Metabolismus blockiert, was sich durch die Tätigkeit der zweiten Isoenzymgruppe erklären läßt.

Nach meiner Meinung sollten viel mehr kinetische Phasen bei Substraten des M O S -Systems existieren, die oft nicht detektiert werden, weil die kinetischen Untersuchungen auf einem zu engen Konzentrationsbereich an Substrat durchgeführt werden.

4.1.5.5 Bedeutung der Ks- und Km-Werte bei M.O.S.-katalysierten Reaktionen

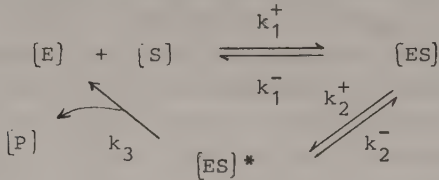
Soweit die kinetischen Parameter, die für verschiedene Substrate gemessen worden sind, vergleichbar sind, zeigt sich, daß alle möglichen Größenordnungen und Relationen anzutreffen sind.

Hier einige Beispiele: Aminopyrin $\text{Ks} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{Km} 8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, Cyclohexan $\text{Ks} = 7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{Km} 4,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, Benzphetamin $\text{Ks} = 3,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\text{Km} = 10^{-4} \text{ M}$, Benzpyren mit 3MC-Cyt. P-450 $\text{Km} = 0,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ andere Angabe $0,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; mit K-Cyt. P-450 $\text{Km} 1,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$,

Coumarin $K_s = 0,9 \cdot 10^{-3}$ M, $K_m = 6 \cdot 10^{-6}$ M*, Daher stellt sich die Frage der Beziehung zwischen den K_m 's und K_s 's beim M O S in der Membran. Es werden Verbindungen mit einer hohen Affinität an Cyt. P-450 gebunden und nicht oder schlecht umgesetzt. Andere weisen eine schlechte Bindung auf, werden aber mit einer niedrigen K_m umgesetzt.

Das zeigt die Grenzen der Aussagekraft der klassischen Enzymkinetikparameter im Falle des Monooxygenase-Systems.

Das können wir folgendermaßen illustrieren; wir beschreiben den Cyt. P-450-Reaktionszyklus mit folgendem einfachem Modell:



Das erste Gleichgewicht beschreibt die Substratbindung, das zweite die Reduktion des Cyt. P-450-Substrat-Komplexes. Der letzte Schritt beinhaltet die Sauerstoffanlagerung, die Übertragung des zweiten Elektrons und die Katalyse.

Das Verhältnis von $\frac{K_m}{K_s}$ wird durch folgenden Ausdruck beschrieben:

$$(1) \quad \frac{K_m}{K_s} = \frac{k_2^- + k_3}{k_2^+ + k_2^- + k_3} + \frac{k_3 k_2^+}{k_1^- (k_2^+ + k_2^- + k_3)}$$

Da die Rückreaktion $ES^* \rightarrow ES$ sehr unwahrscheinlich ist, kann man k_2^- gleich Null annehmen.

Es kommt:

$$(2) \quad \frac{K_m}{K_s} = \frac{k_3}{k_2^+ + k_3} + \frac{k_3 k_2^+}{k_1^- (k_2^+ + k_3)}$$

Danach kann man versuchen, die beobachteten $\frac{K_m}{K_s}$ Verhältnisse zu interpretieren.

* Daten aus Mannering (1971)

Das Verhältnis $\frac{K_{m1}}{K_s} \approx 1$, das mit den 3MC-Mikrosomen gefunden wird, würde dann heißen

$$k_1^- \gg k_2^+, k_3 \text{ und } k_3 \gg k_2^+$$

Der gesamte katalytische Schritt ist dann vernachlässigbar gegenüber der Dissoziation des Enzymsubstratkomplexes, und außerdem ist die erste Elektronenübertragung geschwindigkeitsbestimmend.

In den Fällen, wo $\frac{K_m}{K_s} \gg 1$, hieße es dann, daß $k_1^- \ll k_2^+, k_3$.

Nehmen wir den Fall von PB-Mikrosomen, wo k_2^+ für $Pb(Et)_4$ bestimmt worden ist ($k_2^+ \approx 4 \text{ sec}^{-1}$) und setzen $k_2^+ \approx k_3$ ein, ist das Verhältnis im Falle von $\frac{K_{m1}}{K_s} = 18$. Das würde bedeuten, daß $k_1^- \approx 0,1 \text{ sec}^{-1}$. Mit $\frac{K_{m2}}{K_s} \approx 120$ käme ein $k_1^- \approx 0,016 \text{ sec}^{-1}$. Aus der Kenntnis der Größenordnung von k_1^+ (Geschwindigkeitskonstante für die low spin-high spin-Transition) und der Sättigungskonzentration für die Substratbindung läßt sich nun ein Schätzungswert für k_1^- errechnen. Danach liegt k_1^- mindestens bei 10 sec^{-1} , einem Faktor, der 100 bzw. 500 mal höher als unsere errechneten Werte ist. Insofern haben die K_m und K_s -Werte nicht viel miteinander zu tun, denn das Ausschlaggebende ist der an der Katalyse beteiligte Cyt. P-450-Anteil, der erst durch den Vergleich zwischen turn-over für eine bestimmte Umsetzung und spezifische Aktivität zugänglich ist (Ihlefeld, 1979). Das setzt die Bestimmung von k_3 voraus und liegt außerhalb des Rahmens dieser Arbeit.

Aus den Konstanten können wir nur ersehen, daß $Pb(Et)_4$ eine hohe Affinität für das Cyt. P-450 hat, und daß es mit den gleichen Isoenzymen in K- und PB-Mikrosomen bindet, während die Bindung an 3MC-Cyt. P-450 Moleküle andere Charakteristika aufweist. Ferner ist die Bleiverbindung ein verhältnismäßig gutes Substrat für das Monooxygenasesystem, das von jeweils zwei Isoenzymsubspezies metabolisiert wird, die klar unterschiedliche Gleichgewichtskonstanten aufweisen.

Eine dieser Gruppen, die mit der kleinen Km, wird in Mikrosomen von Kontroll- und Phenobarbital-Präparationen gefunden. Die Gruppen mit der höheren Km sind nicht dieselben in K- und PB-Mikrosomen, weisen aber einen ähnlichen Km-Wert zwischen PB- und 3MC-Mikrosomen auf. Die Subspezies mit der hohen Km sind für den Hauptanteil der Umsetzung verantwortlich. Es kann nicht unterschieden werden, ob es mit der schnelleren Reaktionsgeschwindigkeit oder mit der breiteren Beteiligung der Cyt. P-450-Moleküle zusammenhängt.

4.2. Der mikrosomale Metabolismus von Pb(Met)₄

4.2.1. Meßbedingungen

Die für die Analytik von Pb(Et)₄ aufgestellten optimierten Meßbedingungen sind mit Ausnahme des zeitlichen Verlaufs der Reaktion und der Sättigungskonzentration von NADPH mit Pb(Met)₄ gleich.

4.2.1.1 Zeitabhängigkeit

Die enzymatische Reaktion mit Pb(Met)₄ verläuft weniger als 5 min. Dabei sind die Umsätze sehr hoch und durchweg unterproportional zur Reaktionszeit. Außerdem hört die Produktbildung abrupt auf. Fig. 13 zeigt die Zeitabhängigkeitskurven für verschiedene Pb(Met)₄-Konzentrationen mit PB-induzierten Mikrosomen. Je niedriger die Substratkonzentration, umso mehr nähert sich die Produktbildung 100% an. Bei der sättigenden Pb(Met)₄-Konzentration (10^{-4} M) werden 40% des Substrats umgesetzt. Mit Pb(Met)₄ $2 \cdot 10^{-5}$ M sind es 85%, mit Pb(Met)₄ $4 \cdot 10^{-6}$ M ist die Transformation vollständig.

Wir haben uns gefragt, worauf dieses ungewöhnlich schnelle Erreichen eines Plateaus beruhen könnte. Es ist normal, daß nach einer bestimmten Anzahl von turn-overs ein Enzymmolekül nicht mehr aktiv ist. Im Falle von Pb(Met)₄ ist es möglich, daß die

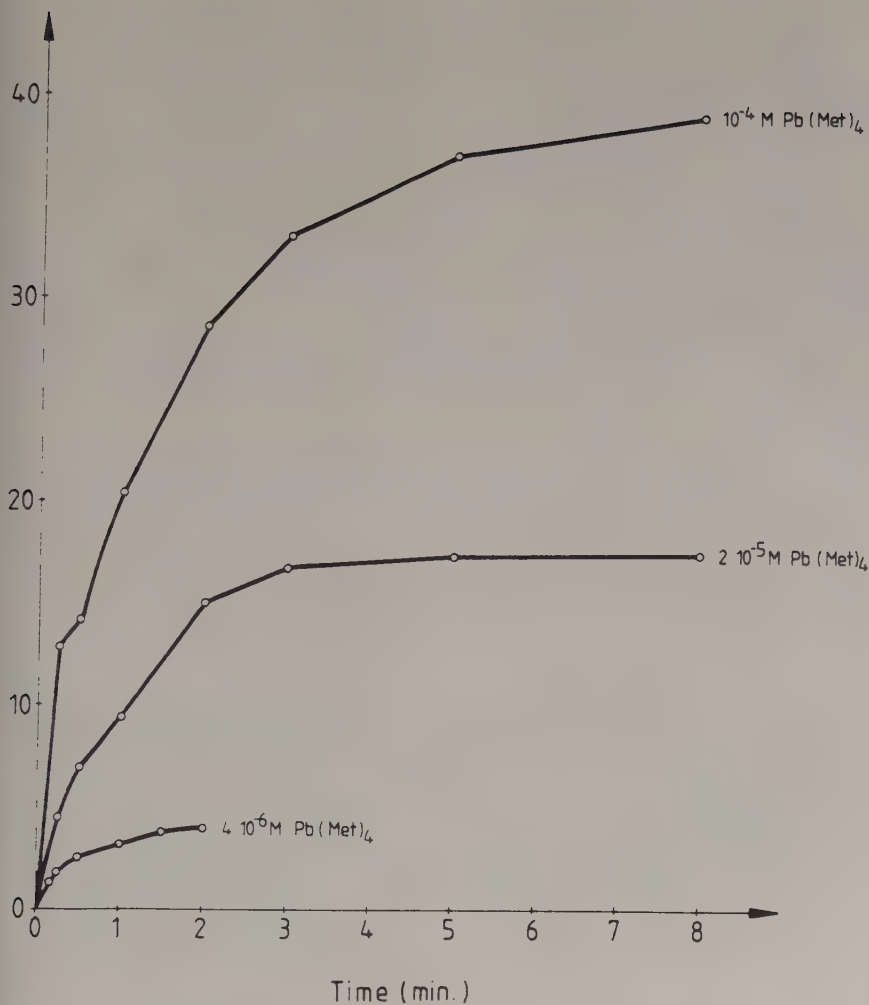


Fig. 13: Zeitverlauf der $\text{Pb}(\text{Met})_4$ Demethylierung bei verschiedenen Substratkonzentrationen. (Mikrosomen von Phenobarbital-induzierten Ratten)

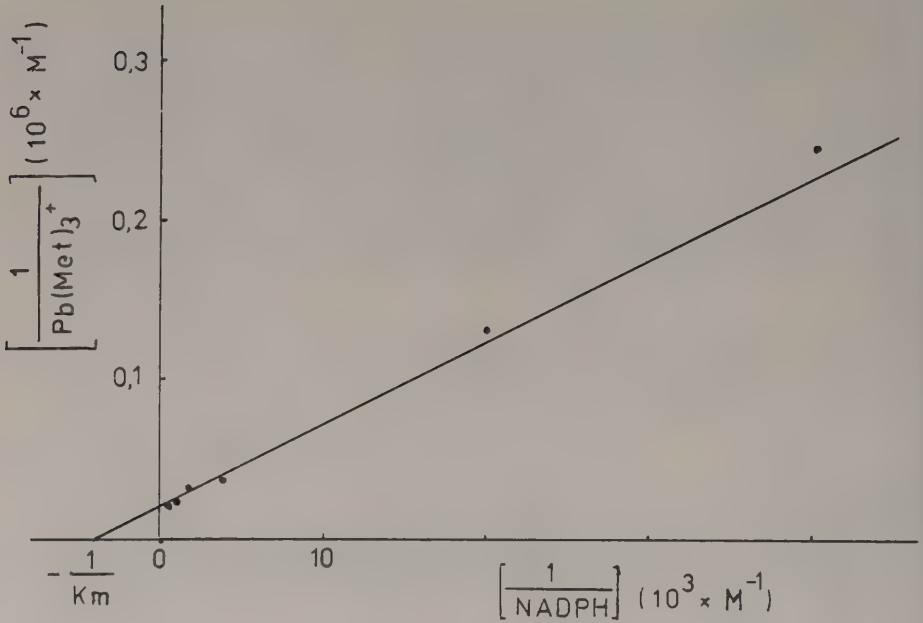


Fig. 14: Abhängigkeit der Pb(Met)_3^+ -Bildung von der NADPH-Konzentration.

Lineweaver-Burk Plot.

(Pb(Met)_4 : 10^{-4} M; Protein : 0,5 mg/ml; Reaktionszeit: 2 min; PB-Mikrosomen.)

schnelle Aktivität eher auf einem schnellen turn-over als auf einem breiten pool von Cyt. P-450-Molekülen beruht. Außerdem habe ich festgestellt, daß das Produkt $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ eine Inaktivierung des Enzymsystems, gemessen an dem gesamten P-450-Gehalt, bewirkt. $\text{Pb}(\text{Met})_3^+ 10^{-3} \text{ M}$ inaktiviert 50% des Cyt. P-450 innerhalb von 5min bei 25° C. Es ist übrigens bekannt, daß $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ in den Mikrosomen die Lipidperoxidation induziert (Ramstoeck, 1980). Auf jeden Fall muß angesichts der nichtlinearen Zeitabhängigkeit die Anfangsgeschwindigkeit als Maß für die spezifische Aktivität genommen werden. So wird insbesondere bei der kinetischen Untersuchung für jede Substratkonzentration eine Zeitabhängigkeit der Produktbildung gemessen und die Tangente an den Nullpunkt gelegt.

4.2.1.2. Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der NADPH-Konzentration

Bei einer Vielzahl von Substraten ist eine NADPH-Konzentration zwischen $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ und $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ sättigend.

Mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$ als Substrat ist die maximale Aktivität erst bei einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ NADPH erreicht. Die reziproke Darstellung der Funktion $\frac{dP}{dt} = f(\text{NADPH})$ ist linear und es kann eine $K_m \approx 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ berechnet werden. Dieser Wert ist außergewöhnlich hoch für eine M O S -Reaktion, aber er ist auch mit anderen Substraten gefunden worden, z.B. der "Aryl-hydrocarbon-hydroxylase" in Mäuselebermikrosomen (Blumer und Mieleval, 1980).

In den Untersuchungen mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$ werden die Messungen mit $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ NADPH durchgeführt (s. Fig. 14).

4.2.1.3 Cofaktoren

Wie $\text{Pb}(\text{Et})_4$ braucht $\text{Pb}(\text{Met})_4$ Sauerstoff und NADPH um dealkyliert zu werden.

Es wird auch keine Stimulierung durch NADH festgestellt, wie aus der Beobachtung der Bildung des Oxykomplexes bei 442 nm hervorgeht. Die Bleitrimethylbildung wird durch Kohlenmonoxid gehemmt. $5 \cdot 10^{-4}$ M Metyrapone hemmt die Reaktion zu 65% unter sättigenden Substratkonzentrationen.

4.2.2. Abbauprodukte des $\text{Pb}(\text{Met})_4$ -Metabolismus

4.2.2.1. Das Dealkylierungsprodukt

Bei qualitativer Anwendung der Dithizonbleibestimmung wird nur das Trimethylbleiion nachgewiesen. Außerdem stimuliert $\text{Pb}(\text{Met})_3\text{Cl}$ weder den NADPH-Verbrauch noch den O_2 -Verbrauch und bewirkt keine kompetitive Hemmung der 7-Äthoxycoumarin Deäthylierung, so daß es nicht als weiteres Substrat von Cyt. P-450 angesehen werden kann.

4.2.2.2. Die Seitenkette

Aus den gleichen Gründen wie bei $\text{Pb}(\text{Et})_4$ als Substrat ist der Versuch gescheitert, einen Alkohol, hier Methanol, als Abspaltungsprodukt nachzuweisen; Methanol wird zwar gefunden, aber ohne quantitativen Zusammenhang mit dem $\text{Pb}(\text{Met})_4$ -Abbau. Es kann daher die Frage nicht beantwortet werden, welches Abspaltungsprodukt nach Hydroxylierung des $\text{Pb}(\text{Met})_4$ entsteht.

4.2.3. Wirkung der Induktion

Pb(Met)₄ wird vom M O S aus unbehandelten, Phenobarbital- und 3-Methylcholanthren-induzierten Tieren demethyliert.

Unter sättigenden Substratkonzentrationen werden insgesamt 8%, 40% und 25% des Pb(Met)₄ bei K, PB und 3MC-Präparationen in weniger als 5min Reaktionszeit umgesetzt (Protein: 0,5 mg/ml). Bei Kontrollmikrosomen liegen die spezifischen Aktivitäten zwischen 1 bis 2 nmol min⁻¹(mg Protein)⁻¹, d.h. 1,5-3 nmol min⁻¹(nmol P-450)⁻¹, bei 37° C. Das sind relativ hohe Werte für unbehandelte Mikrosomen.

Nach Induktion mit 3-MC liegen die spezifischen Aktivitäten zwischen 20 bis 30 nmol min⁻¹(mg Protein)⁻¹ bzw. 14 bis 20 nmol min⁻¹(nmol P-450)⁻¹.

Phenobarbital-Induktion ergibt sehr hohe spezifische Aktivitäten: 40 bis 50 nmol min⁻¹(mg Protein)⁻¹ bzw. 25 bis 35 nmol min⁻¹(nmol P-450)⁻¹.

Selbst angesichts der Meßtemperatur (37° C) sind solche Werte sehr hoch (vgl. Benzphetamin-Demethylierung mit spezifischen Aktivitäten von 10 nmol min⁻¹(mg Protein)⁻¹). Sie zeichnen sich besonders gegenüber den mit Pb(Et)₄ beobachteten Aktivitäten aus. Bei den weiteren Untersuchungen befassen wir uns ausschließlich mit den PB-Mikrosomen.

4.2.4. Bindung des Pb(Met)₄ an Cyt. P-450

4.2.4.1. Bindungsspektrum

Das Bindungsspektrum ist ein klassisches "Typ I" Differenzspektrum. Die maximale Δ A beträgt 0,035/mg Protein bzw. 0,020/nmol P-450, und die Sättigungskonzentration an Pb(Met)₄ liegt bei 10⁻⁴ M.

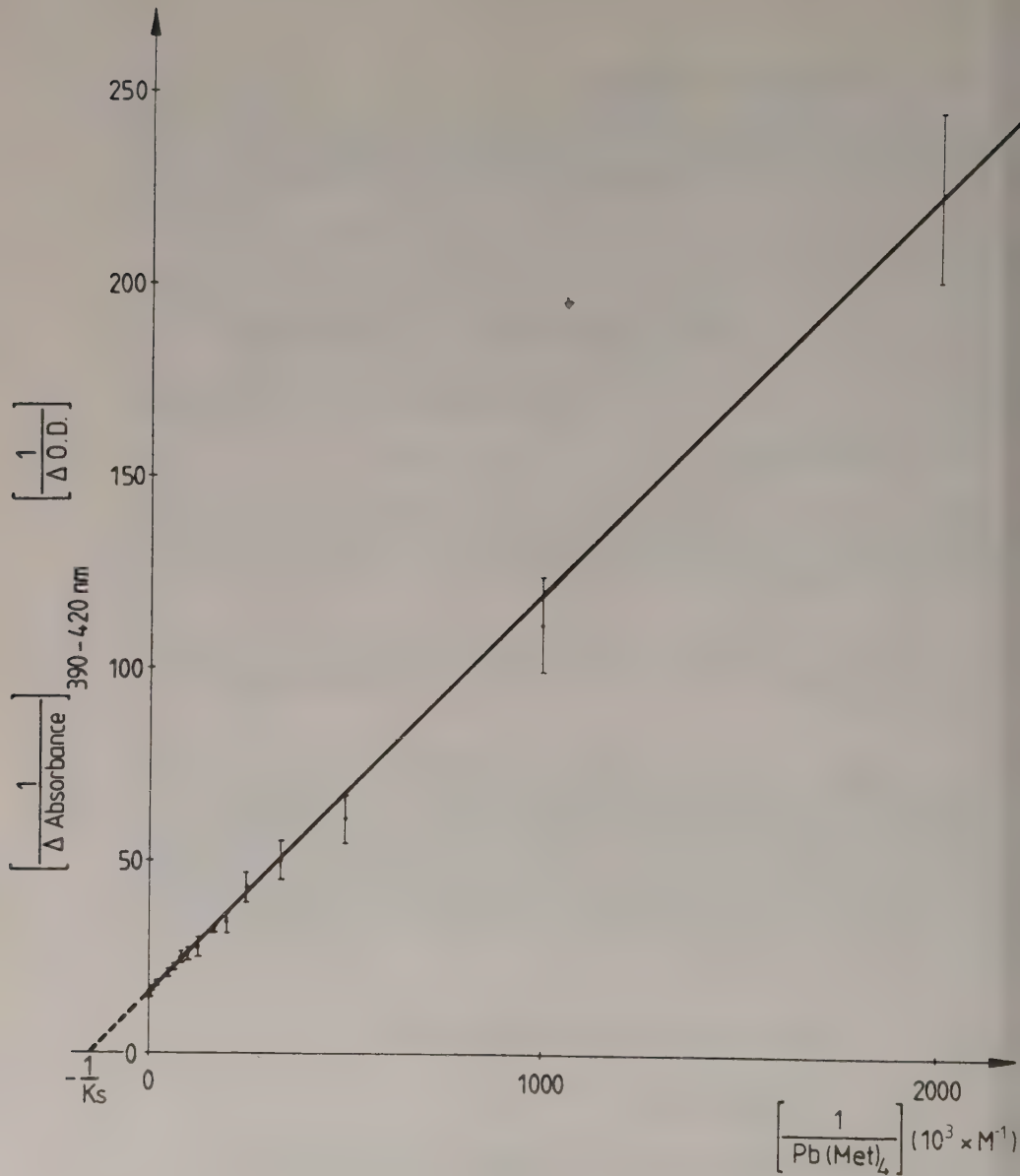


Fig. 15: Bindung von Pb(Met)_4 an Cyt. P-450.

Reziproke Darstellung der Absorptionsdifferenz (ΔA 390-420 nm) als Funktion der Substratkonzentration (PB-Mikrosomen)

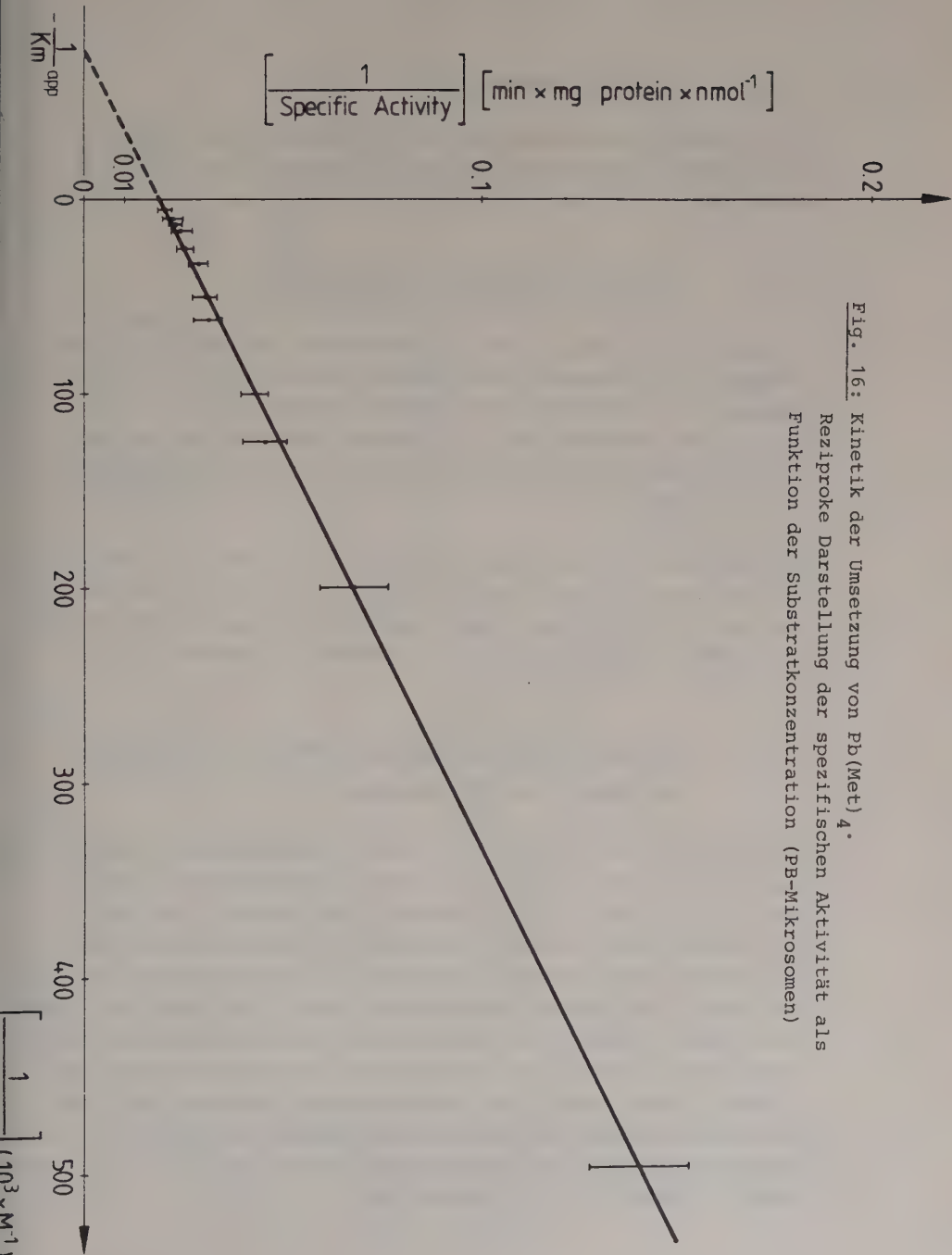


Fig. 16: Kinetik der Umsetzung von Pb(Met)₄.
 Reziproke Darstellung der spezifischen Aktivität als
 Funktion der Substratkonzentration (PB-Mikrosomen)

4.2.4.2. Dissoziationskonstante

Der Lineweaver-Burk Plot der ΔA als Funktion der $Pb(Met)_4$ -Konzentration ist linear und die K_s beträgt $(6,65 \pm 0,73) \cdot 10^{-6}$ M. (Fig. 15).

4.2.5. Kinetik der Umsetzung von $Pb(Met)_4$

Im Falle von $Pb(Met)_4$ wird die Bestimmung der K_m aus der Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten, wie unter 4.2.1.1. beschrieben, als Funktion der Substratkonzentration gemacht. Aus Fig. 16 ist zu sehen, daß die Reaktion monophasisch verläuft; K_m ist $(1,28 \pm 0,18) \cdot 10^{-5}$ M und V_{max} $(53,2 \pm 7,4)$ nmol min⁻¹ (mg Protein)⁻¹.

$Pb(Met)_4$ gehört auch zu den Substraten mit relativ niedrigen K_s und K_m . Dabei ist das Verhältnis $\frac{K_m}{K_s} \approx 2$, so daß besonders angesichts der hohen spezifischen Aktivitäten anzunehmen ist, daß das Substrat, das bindet, auch weitgehend umgesetzt wird.

4.3. Vergleich von $Pb(Et)_4$ und $Pb(Met)_4$ als Substrate vom M.O.S. aus PB-Mikrosomen

Als Illustration der differenzierten Interaktionen der Subspezies im M O S mit Substraten, die eine sehr ähnliche chemische Struktur besitzen, will ich $Pb(Et)_4$ und $Pb(Met)_4$ vergleichen. Der Ausgangspunkt ist die Tatsache, daß beide Substrate mit einem gemeinsamen Anteil an eine Cyt. P-450-Spezies binden. Der Umfang der gesamten Bindung von $Pb(Et)_4$ ist fast das Doppelte dessen von $Pb(Met)_4$ und das Verhältnis der K_s -Werte liegt bei drei. $Pb(Et)_4$ bindet mit einer dreimal höheren Affinität als $Pb(Met)_4$. Wenn $Pb(Met)_4$ zu PB-Mikrosomen zugegeben wird, gibt es ein bestimmtes Differenzspektrum (Fig. 17). Addition von $Pb(Et)_4$ produziert ein Bindungsspektrum mit der Amplitude, die auch von $Pb(Et)_4$ allein gegeben wird.

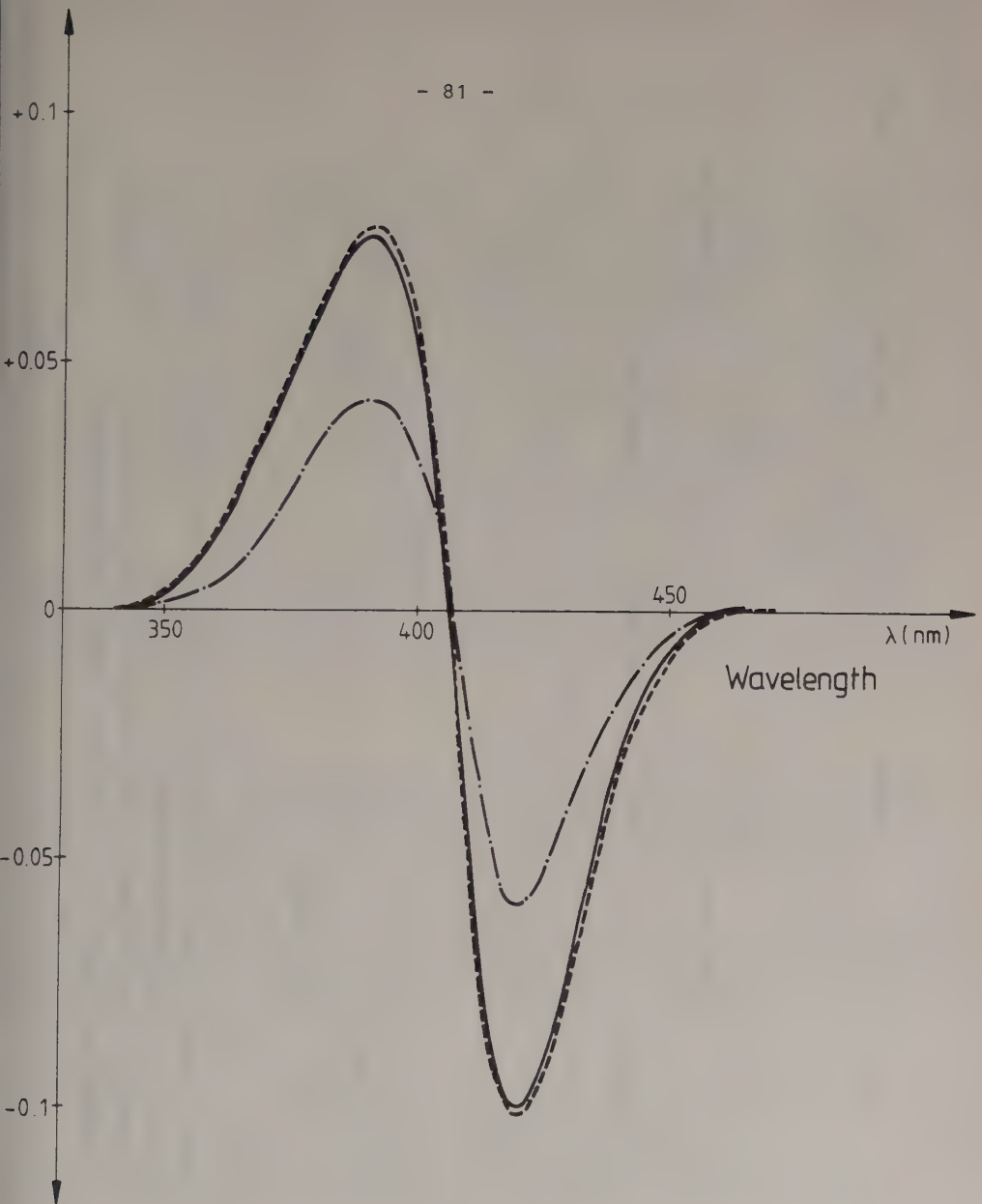


Fig. 17: Bindungs-differenzspektren von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ mit PB-Mikrosomen unter Sättigungskonzentrationen $\text{Pb}(\text{Met})_4$ (-.-.-), $\text{Pb}(\text{Et})_4$ (—), beide Substrate (----). (Protein 3 mg/ml)

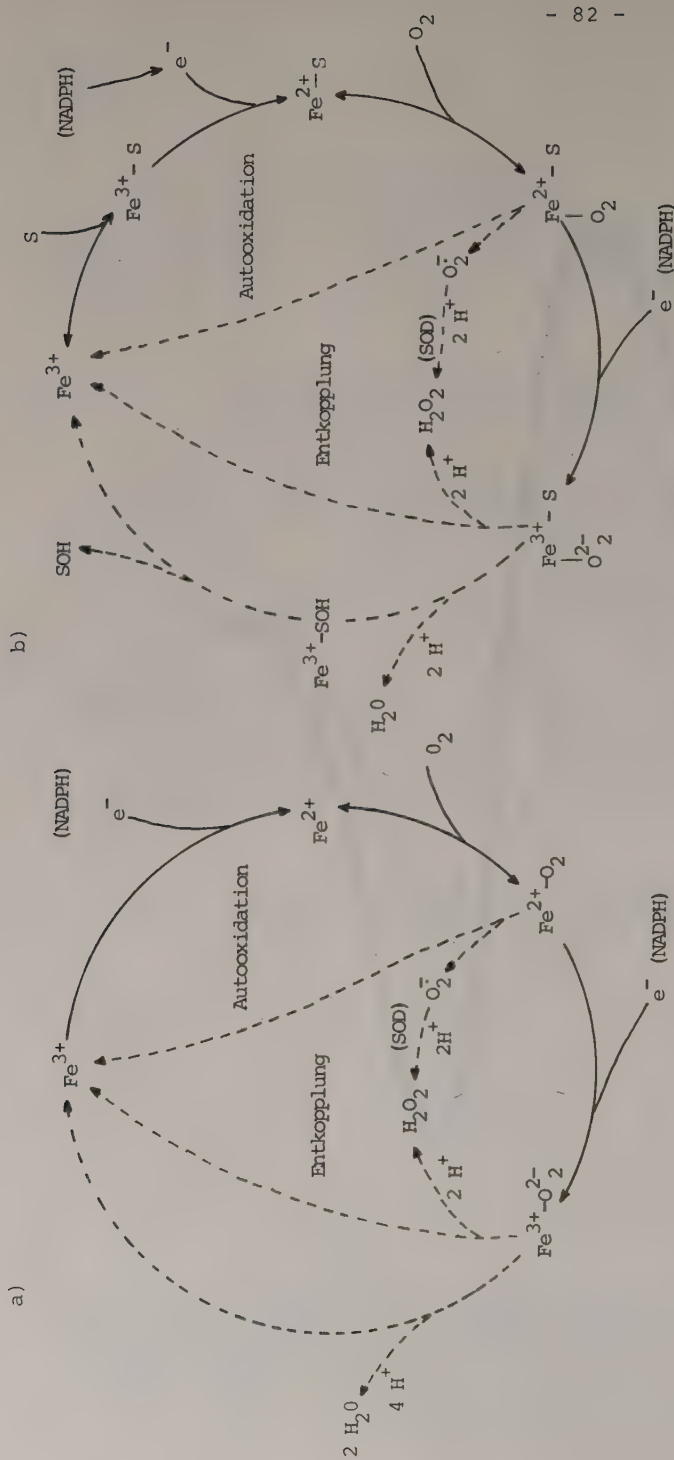


Fig. 18: Mögliche Wege der Sauerstoffreduktion im Cyt. P-450-Reaktionszyklus und ihre Konsequenzen auf die Stoechiometrie

a) Redoxzyklus in Abwesenheit von Substrat, b) mit Substrat. Fe^{2+} , Fe^{3+} Redoxzustand des Hämproteins, S Substrat, SOD Superoxiddismutase

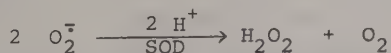
Umgekehrt zeigt die Zugabe von $\text{Pb}(\text{Met})_4$ nach $\text{Pb}(\text{Et})_4$ keine weitere additive Wirkung auf die low spin-high spin Verschiebung des beteiligten Cyt. P-450 pools. Da $\text{Pb}(\text{Et})_4$ die niedrigere K_s hat, bedeutet dies, daß es $\text{Pb}(\text{Met})_4$ aus den Bindungsstellen verdrängt. Es heißt auch, daß $\text{Pb}(\text{Met})_4$ an dieselben Subspezies bindet wie $\text{Pb}(\text{Et})_4$, das wiederum noch an weitere Isoenzyme bindet. Wenn das so ist, ist es sinnvoll, die Substrate bezüglich deren Metabolismus zu vergleichen. Denn aus einem gemeinsamen Cyt. P-450-pool, an dem beide Substrate binden, wird eine spezifische Aktivität mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$ erreicht, die 20 bis 25 mal höher ist als die von $\text{Pb}(\text{Et})_4$. Um herauszufinden, ob das hauptsächlich an der quantitativen Teilnahme der Enzyme oder an einer höheren Wechselzahl der beteiligten Cyt. P-450 Moleküle mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$ als Substrat liegt, habe ich die Wirkung von jedem der Substrate auf den Cyt. P-450-Zyklus geprüft anhand der Kinetik der ersten Elektronenübertragung, des O_2 -Verbrauchs und der NADPH-Oxidation.

4.3.1. Theorie

Wenn NADPH und O_2 in den Mikrosomen vorhanden sind, unterliegt das M O S einem Redox-Zyklus. Der Zyklus der Cyt. P-450-Zustände weist verschiedene Wege für den Redox-Vorgang auf (Fig. 18a).

Das durch Fe^{3+} symbolisierte oxydierte Cyt. P-450 wird in einem Elektronenschritt reduziert. Indem man die Zyklusblockierung durch CO unter strikt anaeroben Bedingungen benutzt, kann man die Kinetik dieses ersten Schrittes verfolgen.

Wie aus Fig. 18a zu sehen ist, erfolgt nach Anlagerung des O_2 , dessen Reduktion, und zwar auf verschiedenen Wegen. Da ist die Autooxidation, wobei der Sauerstoff als Superoxidanion O_2^- freigesetzt wird und in den Mikrosomen durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid disproportioniert wird.



Dabei wird ein NADPH pro O_2 -Molekül verbraucht.

Dann ist die Möglichkeit vorhanden, daß die zweite Elektronübertragung vor der O_2 -Freisetzung erfolgt. In diesem Fall ist es möglich, daß das Peroxidanon als H_2O_2 entweicht, oder daß die Spaltung des O_2 -Moleküls vollzogen wird mit anschließender Reduktion zu Wasser. Im ersten Fall wird auch 1 NADPH/ O_2 verwendet. Im Falle der Wasserbildung und in Abwesenheit von Substrat werden 2 NADPH für ein O_2 benötigt. Wenn die Reduktion des O_2 nach der zweiten Elektronenübertragung stattfindet, spricht man von Entkopplung. Welchen Wegen der Redoxzyklus ohne Substrat folgt, ist umstritten. Ullrich und Kuthan (1980) sagen, daß die Autooxidation der einzige Weg der freien Oxidation ist, und daß Wasserstoffperoxid nur auf diesem Weg gebildet wird. Zhukov und Archakov (1982) schließen nicht die Freisetzung des Peroxidansions als H_2O_2 -Quelle aus und finden, daß die Hälfte des O_2 zu H_2O_2 und die andere Hälfte zu Wasser reduziert wird. Daraus folgt die Stoechiometrie NADPH: $O_2 > 1$ (für die freie Oxidation). Was geschieht, wenn Substrat vorhanden ist? Es gibt eine Verschiebung der Gleichgewichte bei allen Stufen des Zyklus. Die erste Reduktion wird im allgemeinen beschleunigt, der O_2 - und NADPH-Verbrauch werden erhöht, das Verhältnis der Autooxidation zur Entkopplung wird geändert und ein variabler Teil des O_2 wird zur Katalyse verwendet (Fig. 18b). All das ist abhängig von der Qualität des Substrats und abhängig davon, mit welchen Cyt. P-450-Spezies es Wechselwirkungen hat. In dieser Arbeit habe ich nur den Versuch gemacht, aus den untersuchten Parametern erster Reduktion, NADPH-Oxidation und O_2 -Verbrauch im Vergleich mit den spezifischen Aktivitäten, eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten von $Pb(Et)_4$ und $Pb(Met)_4$ als Substrate zu finden.

4.3.2. Wirkung von $Pb(Et)_4$ und $Pb(Met)_4$ auf die erste Reduktion von Cyt. P-450

4.3.2.1. Apparatur und Meßtechnik

Die Kinetik der Reduktion von Cyt. P-450 wird anaerob in Gegenwart von CO mit und ohne Substrat verfolgt.

Dafür wird eine modifizierte Dionex (Durrum) D-103 Stopped-flow Apparatur verwendet und die Kinetik wird mit einem Dual wavelength Spektrophotometer verfolgt, der an einen Datenspeicher und einen Computer angeschlossen wird. Diese Apparatur ist von Ruf (1980) beschrieben worden. Die Daten werden mit Hilfe des multiexponentiellen Fit-Programm DISCRETE nach Provencher (1976) analysiert und als die Summe von vier unabhängigen pseudoerster Ordnung-Reaktionen mit den Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_2 , k_3 , k_4 und deren jeweiliger Amplitude charakterisiert.

Die Ansätze enthalten 50 mM HEPES Puffer, pH 7,6, 125 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0,85 mg/ml mikrosomale Suspension und 0,5 mM NADPH. Ein NADPH-regenerierendes Enzymsystem aus GOD + Katalase und Glucose als Substrat wird verwendet. Die Reduktion wird bei 37° C verfolgt. $Pb(Et)_4$ und $Pb(Met)_4$ sind $5 \cdot 10^{-4}$ M und 10^{-4} M.

4.3.2.2. Stimulierung der ersten Reduktion durch Substrat

Die Substratanlagerung ($Pb(Et)_4$ oder $Pb(Met)_4$) bewirkt eine Verdoppelung der Geschwindigkeitskonstanten der ersten und zweiten exponentiellen Phasen, das sind diejenigen, die für die Umsetzung von Substraten verantwortlich sind (Fig. 19). Beide Substrate besitzen die gleiche Wirkung auf die Reduktionskinetik. $Pb(Et)_4$ und $Pb(Met)_4$ gehören zu den Substraten, deren stimulierende Wirkung in der Erhöhung der k_1 zum Ausdruck kommt. Bei anderen Substraten (in derselben mikrosomalen Qualität, hier Rattenlebermikrosomen, PB-Induktion) kommt das eher in der Erhöhung der Phasenamplitude zum Ausdruck, z.B. mit Benzphetamin als Substrat (Ruf, 1980). Die Differenz der Anfangsgeschwindigkeiten der Reduktion mit Substrat gegenüber derjenigen ohne Substrat beträgt $49 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ für $Pb(Met)_4$ und $73 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ für $Pb(Et)_4$. Im großen und ganzen sind das keine wesentlichen Unterschiede, und auf jeden Fall wird die Diskrepanz der spezifischen Aktivitäten nicht auf diesen Vorgang zurückzuführen sein. Aber im Falle von $Pb(Met)_4$ könnte bei 37° C die erste Elektronenübertragung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein, denn

Phase Amplitude [Δ O.D.]_{450-470 nm}

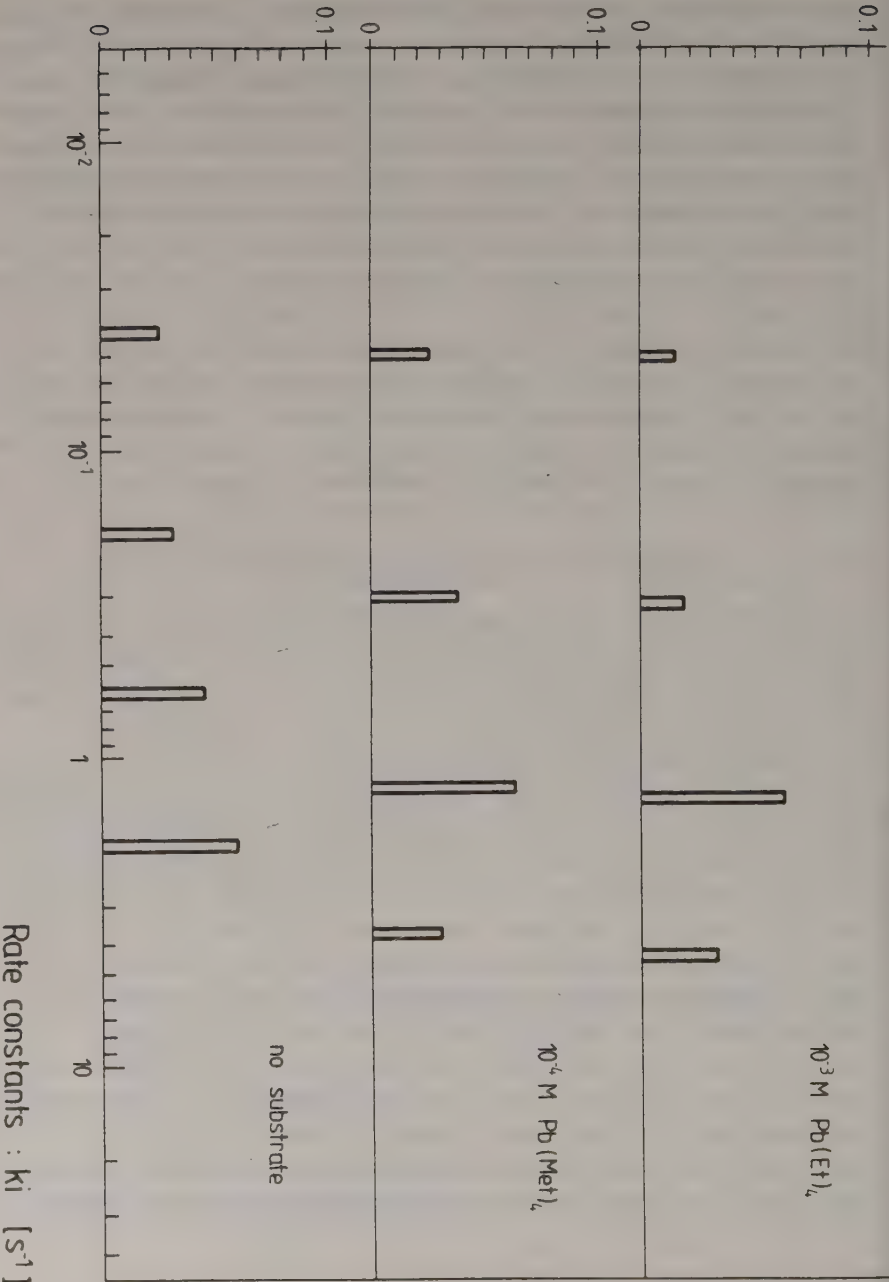


Fig. 19: Wirkung der Substrate Pb(Et)₄ und Pb(Me)₄ auf die Reduktionskinetik des gesamten Cyt. P-450 mit NADPH in einer CO-Atmosphäre. Graphische Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten k₁ und der jeweiligen Amplituden für die 4 Exponentialphasen (best Fit)

$\frac{v_{O_2 \text{ Reduktion}}}{v_{O_2 \text{ Umsatz}}} \approx 1$. Ferner müssen alle Cyt. P-450-Moleküle, die von NADPH reduziert werden, am $Pb(Met)_4$ -Abbau beteiligt sein.

4.3.3. Substratinduzierter Sauerstoffverbrauch

4.3.3.1. Methode

Der Sauerstoffverbrauch wird bei 37° C mit einer Clark-Elektrode gemessen. Dabei ist die Konzentration des gelösten O_2 217 μM .

Die Meßzelle enthält 2 mg mikrosomales Protein, 0,2 mmol Tris-Puffer pH 8 in einem Endvolumen von 2 ml. Die Reaktion wird mit 2 μmol NADPH gestartet. Die Wirkung der Substrate auf die O_2 -Reduktion wird bei sättigenden $Pb(Et)_4$ - und $Pb(Met)_4$ -Konzentrationen (10^{-3} M und $2,5 \cdot 10^{-4}$ M) durchgeführt.

4.3.3.2 Ergebnisse

Ohne Substrat existiert ein O_2 -Verbrauch von 25 bis 30 $nmol \text{ min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$.

Unter Zugabe von $Pb(Met)_4$ und $Pb(Et)_4$ wird der Sauerstoffverbrauch unterschiedlich stark gegenüber dem Verbrauch ohne Substrat stimuliert. $\Delta v = 75,7 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ mit $Pb(Met)_4$ und 25 $nmol \text{ min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ mit $Pb(Et)_4$. Aus den Messungen mit steigender Substratkonzentration werden grobe K_m -Werte von $1,8 \cdot 10^{-5}$ M für $Pb(Met)_4$ und $1,5 \cdot 10^{-4}$ M für $Pb(Et)_4$ gefunden. (Zum Vergleich: die Produktmessungen ergeben $K_m (1,28 \pm 0,18) \cdot 10^{-5}$ M mit $Pb(Met)_4$ und $K_{m2} (2,4 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$ M mit $Pb(Et)_4$.)

4.3.3.3 Diskussion

Aus diesen Messungen kann ein Vergleich zwischen substratinduzierter O_2 -Reduktion und spezifischer Aktivität gezogen werden.

Das Verhältnis $\frac{\text{spez. } O_2\text{-Verbrauch}}{\text{spez. Aktivität}}$ liegt bei 1,5 mit $Pb(Met)_4$ als Substrat und bei 10-12 für $Pb(Et)_4$. (Es liegen keine parallelen

Messungen zu ein und derselben Mikrosomenpräparation vor.) Das bedeutet, daß der Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Met})_4$ sehr effektiv ist. Er korreliert auch mit der Bindung: was an $\text{Pb}(\text{Met})_4$ gebunden wird, reagiert auch mit Cyt. P-450 und die Reaktion führt überwiegend zum Produkt. Da ist kaum Platz für Autooxidation oder Entkopplung. Bei $\text{Pb}(\text{Et})_4$ sieht das ganz anders aus. Bindung des Substrates und Reaktion mit Cyt. P-450 sind einander nicht klar zugeordnet. Und von 10 O_2 -Molekülen, die unter Substrateinwirkung von Cyt. P-450 reduziert werden, wird nur eines für die Bildung des Produktes verwendet. Die neun restlichen werden nicht im Produkt inkorporiert, sondern gehen den Weg der Autooxidation und der Entkopplung. Im Reaktionszyklus des Cyt. P-450 unterscheiden sich $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ in der Effektivität des katalytischen Schrittes.

Es ist uns nicht möglich zu sagen, ob die Sauerstoffaktivierung oder die Hydroxylierung selbst mit $\text{Pb}(\text{Et})_4$ als Substrat schlechter funktioniert als mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$. Die über den O_2 -Verbrauch gemessenen K_m -Werte geben einen weiteren Hinweis. Der K_m -Wert für den durch $\text{Pb}(\text{Et})_4$ stimulierten O_2 -Verbrauch liegt in der Größenordnung der K_{m_2} , wenn die Reaktionsgeschwindigkeit über das Produkt gemessen wird. Die K_{m_2} ist mit den gemessenen spezifischen Aktivitäten verbunden, d.h. vielleicht beschreibt sie diejenige Cyt. P-450-Subspezies, die zwar sehr ungünstige Wechselwirkungen mit dem Substrat hat ($\rightarrow$ Entkopplung), die aber quantitativ stark repräsentiert ist gegenüber der Subspezies mit der niedrigen K_m , und die faktisch für den Hauptteil der $\text{Pb}(\text{Et})_4$ -Metabolisierung verantwortlich ist.

4.3.4. Substratinduzierte NADPH-Oxidation

4.3.4.1. Methode

Die NADPH-Oxidation wird bei 366 nm ($\epsilon_{366} = 3,45 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und bei 37° C an einem Aminco-DW 2-Spektrophotometer in Split Beam Mode gegenüber einer Referenz ohne NADPH gemessen. Der Ansatz in beiden Küvetten enthält 1 mg mikrosomales Protein, 0,1 mmol Tris Puffer pH 8, 5 $\mu\text{mol MgCl}_2$ in einem 1 ml-Endvolum. Die Reaktion wird durch Addition von 0,2 μmol NADPH in die Probeküvette gestartet.

Die Extinktionsabnahme ohne Substrat wird 1 min verfolgt und dann werden $\text{Pb}(\text{Et})_4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ oder $\text{Pb}(\text{Met})_4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ zugegeben und die Reaktion eine weitere Minute verfolgt.

4.3.4.2. Ergebnisse

Ohne Substrat werden $30-40 \text{ nmol (min)}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ NADPH oxidiert. Unter Addition von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ erfolgt eine Stimulierung der NADPH-Oxidation, die $27 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ beträgt. Das ist in der Größenordnung des Sauerstoffverbrauchs.

Mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$ als Substrat konnte der Verbrauch unter sättigenden Bedingungen nicht gemessen werden, denn die absolute Extinktion einer $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ NADPH-Konzentration ist zu hoch gegenüber ihrer Veränderung durch die Oxidation. Deswegen wird unter nicht sättigenden NADPH-Konzentrationen gearbeitet und mit der spezifischen Aktivität unter gleichen Bedingungen verglichen. Die stimulierte NADPH-Oxidation beträgt $20 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, gegenüber der spezifischen Aktivität von $14 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Das Verhältnis $\frac{\text{spez. NADPH-Verbrauch}}{\text{spez. Aktivität}}$ ist 1,4 und vergleichbar mit der Relation, die aus dem O_2 -Verbrauch bestimmt wurde, nämlich 1,5. Somit wird das Ergebnis aus den Sauerstoffmessungen bei beiden Substraten bestätigt.

4.3.4.3. Diskussion

Meine vergleichenden Messungen von O_2 - und NADPH-Verbrauch lassen keine Rückschlüsse zur Alternative Autooxidation oder Entkopplung zu.

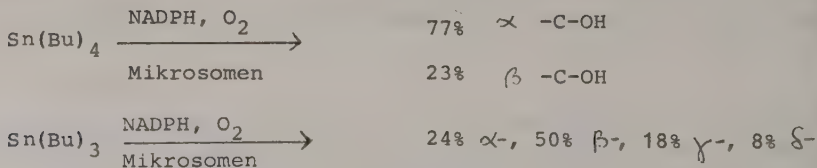
Die NADPH: O_2 Stoechiometrie von 1 zu 1 ist gleich mit beiden Substraten (ohne Berücksichtigung der Produktbildung). Außerdem wissen wir, daß $\text{Pb}(\text{Met})_4$ und $\text{Pb}(\text{Et})_4$ sich ziemlich gleich auf die erste Reduktion auswirken, und daß $\text{Pb}(\text{Met})_4$ fast vollständig in Produkt übergeht (NADPH: O_2 : Produkt 1,4:1,5:1). Das läßt vermuten, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ wie schon diskutiert zur Autooxidation oder Entkopplung führt. Autooxidation hieße, daß die Bindung des $\text{Pb}(\text{Et})_4$ an das

Cyt. P-450 die Sauerstoffaktivierung hemmt. Entkopplung hätte eher mit der relativ schlechten Hydroxylierbarkeit zu tun.

Wenn wir nach der Theorie von Ullrich und Kuthan (1980) gehen ($\text{NADPH}:\text{O}_2$ 1:1 = Autooxidation, $\text{NADPH}:\text{O}_2$ 2:1 = Entkopplung, i.e. ausschließliche Reduktion des O_2 zu Wasser), dann müssen wir aus unserer $\text{NADPH}:\text{O}_2$ Stoechiometrie schließen, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ die Autooxidation des Cyt. P-450 fördert, wenn es nicht zu Produkt umgesetzt wird. Wenn wir uns an Zhukov und Archakov's Ergebnissen und Interpretationen orientieren (Entkopplung kann H_2O_2 -Bildung aus dem Peroxydkomplex genauso wie H_2O -Bildung bedeuten), dann schließt die $\text{NADPH}:\text{O}_2$ = 1:1 Stoechiometrie, die wir beobachten, nicht aus, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ den Weg der Entkopplung begünstigt, d.h. daß dieses Substrat den aktivierten Sauerstoff nicht so gut inkorporiert.

4.3.5. Hypothese über die unterschiedliche Umsetzung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$

Ich denke, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ Entkopplung verursacht, und daß mindestens zum Teil der Unterschied in der Metabolisierung von $\text{Pb}(\text{Met})_4$ und $\text{Pb}(\text{Et})_4$ in der unterschiedlichen Reaktivität liegt. Ich stütze mich dabei auf die Befunde von Fisch, Kimmel und Casida (197) über Butylzinnverbindungen. Es gibt ein Wechselspiel zwischen der Reaktivität der Kohlenstoffatome an der Alkylkette, die mit der Proximität des Metallatoms zunimmt, und den sterischen Hindernissen.



Aus Analogie ist vorstellbar, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ an beiden Kohlenstoffatomen der Ethylkette hydroxyliert wird und daß die β -Stelle, obwohl weniger reaktiv als die α -Stelle, eine bessere Accessibilität aufweist, und bevorzugt angegriffen wird. An dem

Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Met})_4$ wird dann klar, daß die α -Stelle, wenn keine sterischen Hindernisse vorkommen, viel besser reagiert, d.h. viel effektiver ist. Somit würde sich die Entkopplung bei $\text{Pb}(\text{Et})_4$ erklären lassen.

Um diese Frage zu klären, wäre einerseits der klare Beweis einer Reaktion von beiden Substraten mit derselben Cyt. P-450-Subspezies notwendig. Zu diesem Zweck könnte eine Zweisubstratkinetische Studie gemacht werden, wie sie z.B. mit Ethylmorphin und 3-Methyl-4-Methylaminoazobenzol (3 MMAB) als Substrate von M O S in 3,4 Benzpyren, Phenobarbital und 3-Methylcholanthren induzierten Ratten durchgeführt wurde (Sladek und Mannering, 1969 a, b).

Aber schon die qualitative und quantitative Bestimmung der Alkylketten und die Klärung ob Ethanol und nicht nur Ethan und Ethylen gebildet werden, wäre schon ein wichtiger Beitrag. Aus den Ergebnissen von Prough et al. (1981), die hauptsächlich Ethylen finden, ist stark vermutbar, daß $\text{Pb}(\text{Et})_4$ hauptsächlich in β -Position attackiert wird.

4.4 Metabolismus von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ in vivo und in vitro

Aus dem Vergleich der spezifischen Aktivitäten geht hervor, daß das Verhältnis der $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ zur $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ -Bildung bei 3-4 mit Kontrollmikrosomen als enzymatische Quelle, 8-12 mit 3-MC- und 20-25 mit PB-Mikrosomen liegt. In jedem Fall wird $\text{Pb}(\text{Met})_4$ wesentlich schneller umgesetzt als $\text{Pb}(\text{Et})_4$. In den in vivo-Untersuchungen von Cremer (1959) und Cremer und Callaway (1961) dagegen wurde beobachtet, daß mehr $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ als $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ gebildet wurde. Dabei wurden vier Stunden nach intraperitonealer Verabreichung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ (20 mg/kg) bzw. $\text{Pb}(\text{Met})_4$ (40 mg/kg) 45 μg $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ pro g Leber und nur 6,7 μg $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ pro g Leber gemessen, d.h. es war siebenmal mehr $\text{Pb}(\text{Et})_4$ als $\text{Pb}(\text{Met})_4$ umgesetzt worden. Für die gleiche Zeit wurde 20 mal mehr $\text{Pb}(\text{Et})_3^+$ als $\text{Pb}(\text{Met})_3^+$ im Blut gefunden. Dieses Ergebnis wurde auf den schnelleren Abbau

von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ zurückgeführt. Meine in vitro-Untersuchung, die die molekulare Basis für den $\text{Pb}(\text{Et})_4$ - und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ -Abbau aufstellt, zeigt, daß es nicht der Fall ist. Somit liefert sie einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des $\text{Pb}(\text{Et})_4$ - und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ -Metabolismus, zugleich als Richtigstellung und Ergänzung der in vivo-Befunde. Denn es konnte bewiesen werden, daß, wie vermutet, die im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte, NADPH-abhängige biologische Transformation von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ und $\text{Pb}(\text{Met})_4$ tatsächlich dem MOS mit Cyt. P-450 als terminaler Oxidase zuzuordnen ist. Es konnte ferner gezeigt werden, daß abgesehen von den spezifischen Aktivitäten beider Substrate sich auch ihre Bindungscharakteristika, ihre kinetischen Parameter und ihr Einfluß auf den Cyt. P-450 Redox-Zyklus stark unterscheiden. Zwar besitzt $\text{Pb}(\text{Et})_4$ eine dreimal höhere Affinität für das Enzym als $\text{Pb}(\text{Met})_4$, letzteres wird dennoch schneller umgesetzt. An den K_m 's wird deutlich, daß innerhalb eines Induktionszustandes ($\text{Pb}(\text{Et})_4$ von zwei verschiedenen Isoenzymsubspezies umgesetzt wird, während die Michaelis-Menten-Kinetik der $\text{Pb}(\text{Met})_4$ -Umsetzung monophasisch ist.

Die außergewöhnlich hohen spezifischen Aktivitäten für $\text{Pb}(\text{Met})_4$ beruhen nicht so sehr auf der Menge des beteiligten Cyt. P-450, sondern mehr auf der Effektivität der Monooxygenierung, die der Dealkylierung vorausgeht. Eine Stoechiometrie $\text{NADPH}:\text{O}_2:\text{Produkt}$ von 1,4:1,5:1 mit $\text{Pb}(\text{Met})_4$ als Substrat und von 12:12:1 mit $\text{Pb}(\text{Et})_4$ wurde gefunden. Das weist auf die starke entkoppelnde Wirkung von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ im Cyt. P-450 Redox-Zyklus hin, die wiederum mit den unterschiedlichen Reaktivitäten der Kohlenstoffatome in α - und β -Stellung der Alkylketten zusammenhängt.

Insofern kann die Interpretation von Cremer und Callaway (1961) für die höhere Produktbildung bei $\text{Pb}(\text{Met})_4$ in vivo nicht weiter akzeptiert werden. Die Erklärung muß in der unterschiedlichen Aufnahme und Verteilung beider Verbindungen gesucht werden. Das flüchtigere $\text{Pb}(\text{Met})_4$ einerseits wird zum großen Teil ausgeatmet, das lipophilere $\text{Pb}(\text{Et})_4$ andererseits löst sich besser in der Membran, so daß die tatsächlichen Substratkonzentrationen mit

den verabreichten Bleimengen nicht mehr korrelieren und dementsprechend werden die apparenten metabolischen Raten zugunsten von $\text{Pb}(\text{Et})_4$ als Substrat verschoben.

Dies illustriert die Wichtigkeit paralleler in vivo- und in vitro-Untersuchungen bei der Aufklärung des Metabolismus und der Toxizität von Fremdstoffen.

Literatur

Aldridge W.N. and Cremer J.E. (1955)

The biochemistry of organotin compounds.

Diethyltin dichloride and triethyltinsulphate.

Biochem. J. 61, 406

Aldridge W.N. and Cremer J.E. (1957)

Organotin - dithizone Complexes.

The colorimetric determination of diethyl and triethyl compounds.

Analyst. 82, 37

Aldridge W.N. (1976)

The influence of organotin compounds on mitochondrial functions.

in Organotin compounds. New chemistry and applications.

Zuckermann (Ed)

Gould R.F. American chemistry society. Ch. 13, pp. 186-197

Aldridge W.N., Street B.W. and Skilleter D.N. (1977)

Oxidative phosphorylation. Halide dependent and halide independent effects of triorganotin and triorganolead compounds on mitochondrial functions. Biochem. J. 168, 353

Allan S.E. (1961)

The use of organic solvents in atomic absorption spectrophotometry.

Spectrochim. Acta. 17, 467

Bergmeyer H.V. (1974)

Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. 2

Verlag Chemie, p. 1252

Björkhem I. (1982)

Rate limiting step in microsomal cytochrome P-450 catalysed hydroxylations.

in Hepatic cytochrome P-450 monooxygenase system.

Schenkman J.B. and Kupfer D. (Eds.)

Pergamon Press. p. 645-666

- Blumer J.L. and Mieyal S.S. (1980)
Methylcholanthrene and TCDC-induced alterations in microsomal electron transport in inbred mice.
in Microsomes, Drug oxidations and chemical carcinogenesis
Academic Press, S. 521
- Bode, H. und Fabian H. (1958)
Organische mit Wasser nicht mischbare Lösungsmittel in der
Flammenphotometrie.
Zeit. f. Analyt. Chem. 162, 328
- Bolanowska W. (1968)
Distribution and excretion of triethyl lead in rats.
Br. J. Ind. Med. 25, 203
- Bolanowska W. and Wisniewska-Knypf S.M. (1971)
Dealkylation of tetraethyl lead in the homogenates of rat
and rabbit tissues.
Biochem. Pharmacol. 20, 2108
- Bridges J.W., Davies D.S. and Williams R.T. (1967)
The fate of ethyltin and diethyltin derivatives in the rat.
Biochem. J. 105, 1261
- Capdevila J., Saeki Y. and Falck J.R. (1984)
The mechanistic plurality of cytochrome P-450 and its biological
ramifications.
Xenobiotica Vol. 14, Nr. 1/2, 105
- Casida J.E., Kimmel E.C., Holm B. and Widmark G. (1971)
Oxidative dealkylation of tetra-, tri- and dialkyl tins and
tetra- and trialkyl lead by liver microsomes.
Acta Chem. Scand. 25, 1497
- Coon M.S. (1980)
Cytochrome P-450. in Metal ion activation of dioxygen.
Spiro T.G. (Ed)
John Wiley and Sons. Ch. 2, p. 107

Coon M.S., Black S.D., Koop D.R., Morgan E.T. und Tarr G.E. (1982)
Structural and catalytic studies with purified microsomal
enzymes. in Microsomes, Drug oxidations and drug toxicity.
Sato R. and Kato R. (Eds.)

Japan scientific societies press, Tokyo. S. 13-23

Cooper D.Y., Narasimhulu S., Rosenthal O. and Estabrook R.W. (1968)
Studies on the mechanism of C-21 hydroxylation of steroids by the
adrenal cortex. in Functions of the adrenal cortex.

Chap. 23, S. 897

K.W. McKeins (Ed.), Amsterdam. North Holland Publ. Comp. (1968)

Cooper D.Y., Schleyer H., Levin S.S., Eisenhardt R.H., Novack B.G.
and Rosenthal O. (1979)

A reevaluation of the role of cytochrome P-450 as the terminal
oxidase in hepatic microsomal mixed function oxidase catalysed
reactions.

Drug Metabolism reviews 10 (2) 153

Costa G. (1950)

Ann. Chim. (Rome) 40, 541

durch C.A. 45, 6507 (1951)

Costa G. (1951)

Ann. Chim. (Rome) 41, 207

durch C.A. 45, 10094 (1951)

Cremer J.E. (1956)

The in vitro metabolism of tissue slices from rats given
triethyltin compounds.

Biochem. J. 64, p. 51

Cremer J.E. (1957)

The metabolism in vitro of tissue slices from rats given tri-
ethyltin compounds.

Biochem. J. 67, 87

Cremer J.E. (1958)

The biochemistry of organotin compounds.

The conversion of tetraethyltin into triethyltin in mammals.

Biochem. J. 68, 685

Cremer J.E. (1959)

Biochemical studies on the toxicity of tetraethyllead and other organo-lead compounds.

Br. J. Ind. Med. 16, 191

Cremer J.E. (1961)

The toxicity of tetraethyllead and related alkyl metallic compounds.

Ann. Occup. Hyg. 3, 226

Cremer J.E. and Callaway S. (1961)

Further studies on the toxicity of some tetra- and trialkyl lead compounds.

Br. J. Ind. Med. 18, 277

Cremer J. (1968)

Some influences of triethyltin on brain glucose metabolism in vivo and in vitro.

Biochem. J. 106, p. 9

Cremer J.E. (1984)

Possible mechanisms for the selective neurotoxicity in Biological effects of organolead compounds.

Grandjean P. (Ed.)

CRC press. Ch. 15, p. 207-218

Dagnall R.M., West T.S. (1964) Talanta 11.1553

Zitiert in Atomabsorptionsspektroskopie

B. Welz. Verlag Chemie (1975), S. 154

De Vries S.F., Law-Zecha A. and Pellicy A. (1959)

Polarographic determination of hexaethyldilead in tetraethyllead

Analytical Chemistry Vol. 31, Nr. 12, 1955

Diehl H., Capalna S. and Ullrich V. (1969)

The photochemical action spectrum of the carbon monoxide inhibited hydroxylation of cyclohexane by rat liver microsomes
FEBS Lett. 4, 99

Estabrook R.W., Cooper D.Y. und Rosenthal O. (1963)

The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex.
Biochem. Z. 338, 741

Estabrook R.W., Chacos N., Martin-Wixtrom C. and Capdevila S. (1982)

Cytochrome P-450: a versatile vehicle of variable veracity.
in Oxygenases and oxygen metabolism.
Nozaki N. et al. (Eds.)

Academic Press, New York, p. 371

Ferreira da Silva D. and Diehl H. (1983 a)

Metabolism of tetraorganolead compounds by rat-liver microsomal monooxygenase.

I. Analytical methods for quantitative determination of dealkylation products.

Xenobiotica Vol. 13/10, 577

Ferreira da Silva D., Diehl H. and Schröder U. (1983 b)

Metabolism of tetraorganolead compounds by rat-liver microsomal monooxygenase.

II. Enzymic dealkylation of tetraethyl lead.

Xenobiotica 13/10, 583

Fisch R.H., Kimmel E.C. and Casida S.E. (1975)

Bioorganotin chemistry. Biological oxidation of tri-butyltin derivatives.

J. Organometal. Chem. 93, C1-C4

Fisch R.H., Kimmel E.C. and Casida S.E. (1976 a)

Bioorganotin chemistry. Reaction of tributyl tin derivatives with a cytochrome P-450 dependent monooxygenase system.

J. organometal. chem. 118, 41

Fisch R.H., Kimmel E.C. and Casida S.E. (1976 b)
Bioorganotin chemistry. Biological oxidation of organotin
compounds.

in Advances in chemistry series Bioorganotin compounds:
New chemistry and applications.

Zuckermann (Ed.), Ch. 14, S. 197-203

Fisch R.H., Casida S.E. and Kimmel E.C. (1977)
Bioorganotin chemistry. Situs and Stereoselectivity in the
reaction of cyclohexyltriphenyl tin with a cytochrome P-450
dependent monooxygenase enzyme system.
Tetrahedron lett. 40, 3515

Garfinkel D. (1958)
Studies on pig liver microsomes I. Enzymic and pigment
composition of different microsomal fractions.
Arch. Biochem. Biophys. 77, 493

Grandjean P. (1984)
Organolead exposures and intoxications.
in Biological effects of organolead compounds.
Grandjean P. (Ed.) CRC press. Ch. 17, p. 227-242

Groves S.T., McClusky G.A., White R.E. and Coon M.S. (1978)
Aliphatic hydroxylation by highly purified liver microsomal
cytochrome P-450. Evidence for a carbon radical intermediate.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 154

Groves S.T. (1980)
Mechanisms of metal-catalysed oxygen insertion.
in Metal ion activation of dioxygen.
Spiro T.G. (Ed.), Ch. 3

Gutniak O.H., Kosiolowa U. and Kowalski E. (1964)
Free protoporphyrin content of erythrocytes in chronic tetraethyl
lead poisoning. Lancet I. 1/37

Hamilton G.A. (1974)

Chemical models and mechanisms for oxygenases.
in Molecular mechanisms of oxygen activation
Hayaishi O (Ed.), Academic Press, New York
CH. 10, pp. 405-451

Heard M.S., Wells A.C., Newton D. and Chamberlain A.C. (1979)
Human uptake and metabolism of tetraethyl and tetramethyl
lead vapor labelled with ^{203}Pb
Presented at Int. Conf. Management and control of heavy
metals in the environment
London, September 18 to 21, 1979; 103

Henderson S.R. and Snyder L.S. (1961)

Rapid spectrophotometric determination of triethyllead,
diethyllead and inorganic lead ions, and application to the
determination of tetraorganolead compounds
Anal. Chem. 33, 1/72

Heyrovsky, S. und Kuta S. (1965)

Grundlagen der Polarographie
Akademie Verlag, Berlin

Ihlefeld, H. (1979)

Untersuchung des turnover einer mikrosomalen Monooxygenase.
Messung und modellhafte Analyse der Anfangskinetik des
Enzymsystems (Dissertation), S. 54

Iwantscheff G. (1972)

Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro- und Spurenanalyse
Verlag Chemie

Jerina D.M. and Daly S.W. (1973)

Mechanisms for the oxidative metabolism of the aromatic nucleus.
in Oxidases and related Redox-Systems.
King T.E., Mason H.S. and Morrison M. (Eds.)
University Park Press, Baltimore Maryland, Vol. 1 p. 143

Kacáč B. und Vejdělek Z.S. (1974)

Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen
(Vol. 1), Verlag Chemie, Weinheim

Kehoe R.A. (1964)

Free protoporphyrin content of erythrocytes in chronic tetra-
ethyllead poisoning
Lancet II 594

Kimmel E.C., Fisch R.H. and Casida S.E. (1977)

Bioorganotin chemistry. Metabolism of organotin compounds
in microsomal monooxygenase system and in mammals.
J. Agric. Food. Chem. 25/1, 1

Kimmel E.C., Casida S.E. and Fisch R.H. (1980)

Bioorganotin chemistry. Microsomal monooxygenase and mammalian
metabolism of cyclohexyltin compounds including the miticide
cyhexatin.
J. Agric. Food. Chem. 28, 177

Klingenberg, M. (1958)

Pigments of rat liver microsomes
Arch. Biochem. Biophys. 75, 376

Koop D.R., Nordblom G.D. and Coon M.S. (1984)

Immunochemical evidence for a role of Cytochrome P-450 in
liver microsomal ethanol oxidation
Arch. Biochem. Biophys. Vol. 235 n° 1, pp. 228-238

Lemonds A.S. and McClellan B.E. (1973)

Correlation of enhancement of atomic absorption sensitivity
for selected metal ions with physical properties of organic
solvents
Anal. Chem. 45 (8), 1455

Lieber C.S. and De Carli L.M. (1970)

Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: in vitro characte-
ristics and adaptive properties in vivo.
J. Biol. Chem. 245, 2505

Lu, A.Y.H. and Coon M.J. (1968)

Role of hemoprotein P-450 in fatty acid CO-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes

J. Biol. Chem. 243, 1331

Lu A.Y.H. and Levin W. (1972)

Partial purification of cytochromes P-450 and P-448 from rat liver microsomes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1334

Luitjen S.G.A. (1972)

Applications and biological effects of organotin compounds. in Organotin compounds Vol. 3, p. 931

Sawayer A.K. (Ed.), Marcel Dekker, New York

Malissa M. und Schöffmann E. (1955)

Über die Verwendung von substituierten Dithio - carbamaten in der Mikroanalyse

Mikrochim. Acta. 1, 187

Mannering G.S. (1971)

in Fundamentals of drug metabolism and drug disposition.

La Du et al. (Eds.), Chap. 12, S. 230

The Williams and Wilkins Company, Baltimore

Matzumara T. (1977)

Chemical models of biological oxygen transfer

Tetrahedron 33, 2869

Mulford C.E. (1966)

Solvent extraction techniques for atomic absorption spectroscopy.

Absorption Newsletter 5 (4), 88

O'Brien P.S. (1982)

Hydroperoxides and superoxides in microsomal oxidations.

in Hepatic cytochrome P-450 monooxygenasesystem

Schenkman S.B. and Kupfer D. (Eds.)

Pergamon Press, Ch. 22, p. 567-586

Oettel H. (1966)

in Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, 17, S. 68
Urban und Schwarzenberg, München/Berlin/Wien

Omura T. and Sato R. (1964)

The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.
J. Biol. Chem. 239, 2370

Omura T., Sanders E., Estabrook R.W., Cooper D.Y. and Rosen-
thal O. (1966)

Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and
a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine
nucleotide - Cytochrome P-450 reductase.

Arch. Biochem. Biophys. 117, 660

Peterson G.L. (1977)

A simplification of the protein assay method of Lowry et al.
which is more generally applicable.

Analyt. Biochem. 83, 346

Proszt S., Cielepsz V. and Györbörő K. (1967)

Polarographie

Akadémiai kiadó (Budapest)

Provencher S.W. (1976)

zitiert von Ruf

J. Chem. Phys. 64, 2772

Prough R.A., Stammelch M.A., Wiebkin P. and Bridges S.W. (1981)

The microsomal metabolism of the organometallic derivatives
of the group IV elements. Germanium, tin and lead.

Biochem. J. 196, 763

Ramstoeck E.R., Hoekstra W.G. and Ganther H.E. (1980)

Trialkyllead Metabolism and lipid peroxidation in vivo in
vitamin E- and Selenium-deficient rats, as measured by
ethane production.

Toxicol. and appl. pharmacol. 54, 251

Razuvaev G.A., Dergunov Yu. I. and Vyazankin N.S. (1961)
Zh. Obshch. Khim. 31, 998
durch C.A. 55, 23321 (1961)

Röderer G. (1984)
Toxic effects in plant organisms.
in Biological effects of organolead compounds.
CH. 7, p. 63-95
Grandjean P. (Ed.) C.R.C. Press

Rosenthal O. und Cooper D.Y. (1967)
Method of determining the photochemical action spectrum.
in Methods in Enzymology Vol. X, S. 616-629
(Estabrook R.W. and Pullman M.E. Volume (Eds.))
(Calowick and Kaplan, series eds.)
Academic Press, New York

Ruf H.H. (1980)
Reduction kinetics of microsomal cytochrome P-450. A reexamination.
in Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450.
Gustafsson S.-A. et al. (Eds.)
Elsevier/North-Holland Biomedical press
pp. 355-358

Schepers G.W.H. (1964)
Tetraethyllead and tetramethyllead.
Comparative experimental pathology.
Arch. Envir. Health 8, 277

Schröder, U. (1984)
persönliche Mitteilung

Selwyn M.S. (1976)
Triorganotin compounds as ionophores and inhibitons of ion
translocating ATPases.
in Organotin compounds. New chemistry and applications
Zuckermann S.S. (Ed.). Advances in chemistry series
Gould R.F. (Series Ed.), American chemical society

Shapiro H. and Frey F.W. (1974)

The organic compounds of lead

Interscience Publishers (John Wiley and sons)

Skilleter D.N. (1975)

The decrease of mitochondrial substrate uptake caused by trialkyltin and trialkyllead compounds in chloride media and its relevance to inhibition of oxidative phosphorylation.

Biochem. J. 146, 465

Skilleter D.N. (1976)

Influence of adenine nucleotides and oxidizable substrates on triethyllead mediated chloride uptake by rat liver mitochondria in KCl media.

Biochem. J. 154, 271

Sladek N.E. and Mannering G.S. (1969)

Induction of drug metabolism.

I. Differences in the mechanisms by which polycyclic hydrocarbons and phenobarbital produce their inductive effects on microsomal N-demethylating Systems.

Mol. Pharmacol. 5, 174

Sladek N.E. and Mannering G.S. (1969)

Mol. Pharmacol. 5, 186

Induction of drug metabolism.

II. Qualitative differences in the microsomal N-demethylating systems stimulated by polycyclic hydrocarbons and by phenobarbital.

Sligar S.G., Gelb M.H. and Heimbrosk D.C. (1984)

Bioorganic chemistry and cytochrome P-450-dependent catalysis.

Xenobiotica Vol. 14, N1/2, 63

Snyder L.S. (1967)

Determination of trace amounts of organic lead in air.

Anal. Chem. 39, 591

Stevens C.D., Feldhake C.S. and Kehoe R.A. (1956)

Isolation of triethyllead ion after inhalation of tetraethyllead.
J. Pharmacol. Exper. Therap. 117, 420

Stevens C.D., Feldhake C.S. and Kehoe R.A. (1960)

Isolation of triethyllead ion from liver after inhalation of tetraethyllead.

J. Pharmacol. Exp. Therap. 128, 90

Teschke R., Ohnishi K., Hasumura Y. and Lieber C.S. (1977)

Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: isolation and reconstitution.

in Microsomes and drug oxidations.

p. 103-110, V. Ullrich Ed., Pergamon Press

Ullrich V. (1972)

Enzymatische Hydroxylierungen mit molekularem Sauerstoff.

Angew. Chem. 184, 15, 689

Ullrich V. and Weber P. (1972)

The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1171

Ullrich V., Frommer U. and Weber P. (1973)

Differences in the O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin after pretreatment with phenobarbital and 3-methylcholanthren.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 514

Ullrich V. (1977)

Die Rolle des Cytochrom P-450 bei der Aktivierung von Pharmaka.

Arzneim. Forsch./Drug Res. 27 (II) Nab, S. 1821

Ullrich V. (1977)

The mechanism of cytochrome P⁻450 action

in Microsomes and drug oxidations. pp. 192-201

V. Ullrich et al. (Eds.), Pergamon Press, New York.

Ullrich V. and Kuthan H. (1980)

Autooxidation and uncoupling in microsomal monooxygenations.
in Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450
S.A. Gustafsson et al. (Eds.)
Elsevier/North-Holland Biomedical Press

Weltz B. (1975)

Atomabsorptionsspektroskopie.
Verlag Chemie / Weinheim

Willis S.B. (1962)

Determination of lead and other heavy metals in urine by atomic
absorption spectroscopy.
Anal. Chem. 34, 614

White R.E. and Coon M.S. (1980)

Oxygen activation by cytochrome P-450
Ann. Rev. Biochem. 49, 315

Zhukov A.A. and Archakov A.I. (1982)

Complete stoichiometry of free NADPH oxidation in liver microsomes.
Biochem. and Biophys. Res. Commun. 109/3, 813

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1980 bis Dezember 1984 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Horst Diehl angefertigt.

Herr Professor Dr. Horst Diehl hat meine Arbeit gefördert.
Herr Professor Dr. Siegfried Boseck stand mir mit Rat zur Seite.

Herr Professor Dr. Bernd Jastorff hat mir Anregungen für den chemischen Bereich gegeben.

Mit Herrn Ulrich Schröder konnte ich fruchtbare fachliche Diskussionen führen.

Herr Dr. Hans Heinrich Ruf (Universität Homburg/Saar) stellte mir seine stopped-flow Anlage zur Verfügung und half mir bei der Messung und Auswertung der Reduktionskinetik.

Frau Christa Lamm hat für mich mit Sorgfalt und Geduld viele Messungen durchgeführt.

Frau Renate Matzullok unterstützte mich bei der praktischen Seite meiner Arbeit im Labor.

An der äußerlichen Form dieser Arbeit war Frau Barbara Bödeker erheblich beteiligt.

Bei allen möchte ich mich für ihre Hilfe herzlich bedanken.

L e b e n s l a u f

- 21.05.1948 geboren in Annecy, Frankreich
- 1953-1966 Staatliches Gymnasium in Annecy
- Juni 1966 Abitur (Baccalauréat Série Philosophie)
- 1966-1968 Studium der französischen Literatur an den
Universitäten von Grenoble und Lyon.
(Erlangung des Diploms "Diplome universitaire
d'études littéraires")
- Mai 1968 Heirat mit Henri Garrigues
- 1969-1974 Chemisch-biologisches Studium an der Universität
von Toulouse/Frankreich,
Abschluß: Meistergrad (Maitrise de biochimie)
- 1974-1977 Hausfrau
- 1977 Scheidung
- 1978 Equivalenz einer deutschen Diplomarbeit an
der Universität Bremen
- seit 1979 angestellt als wissenschaftliche Mitarbeiterin
an der Universität Bremen
- November 1981 Heirat mit Caubi Ferreira da Silva



